

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ALTÉRATIONS MICROBIENNES DES ORGANES CHARNUS DES PLANTES

par LUCIEN HAUMAN-MERCK,

Professeur de Botanique à la Faculté d'Agronomie de Buenos-Aires.

Le point de départ de cette série d'expériences a été l'étude d'une altération grave et très fréquente dont souffrent, au cours de leur conservation pendant l'hiver, tant en Argentine que dans les Républiques voisines, les racines charnues tuberculiformes de la patate douce (*Ipomea batatas*). C'est donc par elle que je commencerai ce mémoire (1).

Ces racines, qui, comme on le sait, sont à la fois amylacées, sucrées et pourvues de cellules laticifères, sont constituées d'un parenchyme jaune clair plus sec et beaucoup plus dense que celui de la pomme de terre, recouvert extérieurement d'une mince couche subéreuse. L'usage en est très populaire et serait probablement plus général encore, sans les sérieuses difficultés de leur conservation, cause sans doute des prix relativement élevés qu'elles atteignent au cours de l'hiver.

(1) Celui-ci était entièrement rédigé quand on m'a signalé dans *Diseases of economic plants*, by F. Stevens and J. Hall (New-York, 1910), p. 289, un court article sur le « Soft rot » de la patate douce causé par *Rhizopus nigricans* Erbg (synon. de *Mucor stolonifer* Erbg). L'article, qui ne donne aucune indication bibliographique, ne comportant qu'une courte description de l'altération (avec photographie de racines atteintes) et des conseils pour la conservation en cave des batates, je n'ai pas cru devoir modifier le texte primitif de mon travail.

En effet, une fois retirées du sol, il est extrêmement fréquent qu'au bout de quelques jours elles commencent à pourrir; de grandes quantités s'en gâtent dans les silos, et, à plusieurs reprises, plus de la moitié des batates qu'on m'avait apportées au laboratoire pour mes essais ont montré après quelques jours la pourriture caractéristique. Celle-ci se manifeste de la manière suivante : sans que, le plus souvent, aucune blessure extérieure ne marque le point d'infection, le parenchyme du tubercule s'amollit complètement, le tissu subérifié restant intact, et l'altération peut, en trois ou quatre jours, envahir entièrement des racines de grande dimension. Si l'on examine au microscope la pulpe molle de la patate attaquée, on voit que ses cellules, dont les grains d'amidon paraissent intacts, sont entièrement dissociées par disparition du ciment pectique qui les unissait, et qu'entre elles circulent des fragments d'un mycélium non cloisonné, peu ramifié, et gorgé de protoplasme; on y trouvera, en outre, surtout si l'altération date de plusieurs jours, une abondante flore microbienne. Au début, les racines ainsi altérées dégagent une odeur alcoolique et légèrement aromatique, et ce n'est que plus tard que l'odeur devient désagréable, sans être jamais nettement putride. Après quelques jours, si la moindre fente ou blessure s'est produite dans la pelure, on y voit apparaître, blanches d'abord, noires ensuite, et pressées les unes contre les autres, comme si elles manquaient de place, les fructifications d'un *Mucor*. Mais si l'on coupe en deux la patate attaquée, avant qu'aucune fructification n'ait encore apparu, ce qui est le cas tant que la pellicule subéreuse reste intacte, et qu'on la mette à l'étuve, de préférence dans une chambre humide, on verra en vingt-quatre heures se développer un mycélium énorme, haut de 4 à 5 centimètres, plus luxuriant qu'il n'est jamais possible de l'obtenir en culture sur patate cuite, et qui, bientôt, se couvrira d'innombrables spores. Mais au cas où on aurait attendu trop longtemps et où la putréfaction bactérienne serait trop avancée, le mycélium aérien ne se développerait que peu ou même pas du tout. Ces phénomènes, que j'ai observés des centaines de fois au cours de ces cinq derniers hivers, sont d'une interprétation facile : le *Mucor*, en sa qualité d'anaérobie facultatif, se développe abondamment à l'intérieur du tubercule où il trouve une abondante

alimentation sucrée et accumule ainsi les réserves qui lui permettront, si l'occasion s'en présente (cas du tubercule coupé), de développer ses hyphes fertiles et ses sporanges, ceux-ci strictement aérobies, avec une luxuriance inaccoutumée. Si, au contraire, aucune sortie vers l'air ne lui est offerte, les bactéries de la putréfaction auront vite fait de tuer le mycélium intérieur. Ce *Mucor* présente tous les caractères du *M. stolonifer* Erbg : propagation par stolons lorsqu'il végète sur la superficie d'un milieu sucré solide, noircissement du mycélium, forme de la columelle et dimension des spores.

Je voulus alors rechercher l'agent spécifique de l'infection et les conditions qui la favorisent.

De premiers essais d'inoculation directe restèrent sans résultat : des disques de patate inoculés avec la pulpe des racines malades se cicatrisèrent sans montrer jamais la moindre altération de leur parenchyme. Echouèrent de même des essais réalisés avec les microorganismes isolés dans les pulpes pourries (le *Mucor*, une levure, plusieurs bactéries, une mucédinée du groupe des *Oospora*) ; toujours, quelques heures après l'infection, la surface blessée était séchée et cicatrisée, ce qui rendait impossible la pénétration ultérieure des microorganismes.

Me souvenant alors du fait que les patates pourries ne présentaient le plus souvent aucune blessure de leur écorce, je pensai me mettre dans des conditions infiniment plus naturelles, en infectant non pas des surfaces mises à nu par le couteau, mais des blessures contuses obtenues en frappant fortement deux racines l'une contre l'autre.

La difficulté consista dès lors à ne pas obtenir l'infection. En effet, les spores du *M. stolonifer*, qui est, comme je le démontrerai, l'agent de la maladie, sont tellement répandues (on le trouve, en effet, sur toutes espèces de fruits trop mûrs) que toute patate contuse est, peut-on dire, une patate pourrie. Il me fallut donc recourir à la désinfection pour pouvoir expérimenter avec certitude : les racines, que l'observation au laboratoire pendant une huitaine de jours avait démontrées parfaitement saines, après un lavage soigneux, étaient mises à tremper une demi-heure dans une solution de sublimé à 1 p. 1000, puis rincées à l'eau stérile. Dans ces conditions, seules ont été attaquées les patates, sur les parties contuses desquelles quel-

ques sporanges du *Mucor* avaient été déposées avec la pointe d'un fil de platine.

Je me suis ainsi rendu compte que c'était à ses propriétés d'anaérobie facultatif que le *Mucor* devait de pouvoir pénétrer dans les tissus très denses de la batate : en effet, une fois développé dans les cellules désorganisées par la contusion, il lui est facile, avant que la partie contuse se soit desséchée et que l'air puisse arriver aux tissus sains sous-jacents, qui, alors seulement pourraient se cicatriser, d'envahir ceux-ci et, grâce à d'actives pectosinases, de les dissocier comme il a été dit. Il suffisait donc, si l'interprétation était exacte, de maintenir dans le vide des racines coupées et inoculées sur leur surface vive avec des spores du *Mucor*, pour obtenir l'infection.

Des rondelles de batates furent placées dans un exsiccateur de Hempel et leur surface vive ensemencée avec une émulsion de chacun des différents organismes isolés dans des batates pourries, puis, aussi vite que possible, le vide fut fait et maintenu au moyen du procédé imaginé par J. Bordet (1), procédé qui fut employé dans toutes les expériences d'anaérobiose dont il sera parlé dans ce mémoire. Dès le second jour, à l'étuve à 27 degrés, une tache brillante apparaissait sur les rondelles ensemencées avec le *Mucor*, et deux jours plus tard la dissociation avait atteint leur face inférieure ; aucun mycélium extérieur n'apparaissait, mais dans la pulpe dissociée les filaments caractéristiques abondaient. Le vide n'ayant pas été rétabli et la cloche ayant été laissée à l'étuve, dès le lendemain un haut duvet blanc, où déjà apparaissaient des sporanges, s'était développé sur les tissus attaqués. Aucune des autres rondelles n'avait subi la moindre altération.

L'expérience, plusieurs fois répétée, a toujours donné les mêmes résultats.

L'inoculation dans le vide, même s'il n'était pas parfait (car plusieurs des exsiccateurs que j'ai employés étaient défectueux), avait donc exactement reproduit l'infection naturelle et démontré le rôle spécifique du *M. stolonifer* (2).

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVIII (1904), p. 332.

(2) Voici quelques indications sur les précautions qu'on pourrait prendre, me semble-t-il, pour empêcher ou tout au moins diminuer les dommages : il faudrait naturellement manier les batates comme on manie les fruits, aussi soigneusement que possible, mais leur faible valeur rend le conseil pratiquement inefficace dès qu'elles doivent subir des transports, ou qu'il s'agit de grande culture. De même l'emploi de substances antiseptiques, en supposant qu'elles puissent être, dans ces conditions, suffisamment actives (j'ai essayé sans succès des bains desulfate de cuivre), est en réalité difficilement applicable. Tout au plus pourrait-on conseiller la conservation dans le soufre des racines destinées à servir de semence. Le seul procédé à l'efficacité pratique duquel je puisse croire est le suivant : récolter tôt, à la fin de l'été, ou aux premiers jours de l'automne, à une époque où, dans les

Ces faits et quelques autres auxquels je vais arriver me conduisirent à reprendre d'une façon plus générale l'étude des altérations microbiennes des organes charnus des plantes, objet de nombreuses recherches parmi lesquelles je veux mentionner, parce qu'elles furent en somme le point de départ de tout ce qui va suivre, celles d'Emile Laurent et de son élève L. Lepoutre, recherches qui se réalisèrent en partie sous mes yeux, à l'époque où, élève aussi du premier, je travaillais dans son laboratoire. L'intérêt de ce genre d'études consista en ce que les organes charnus des plantes (organes de réserve : racines, tiges, feuilles mêmes), constituent, pour des raisons d'ordre pratique, un matériel de choix dans l'étude expérimentale du parasitisme chez les végétaux supérieurs.

On pourrait objecter, il est vrai, qu'il s'agit plutôt là de phénomènes de putréfaction que de parasitisme, bien que, plus encore que le développement normal ultérieur des racines, rhizomes et tubercules, développement dont le siège est étroitement localisé aux points germinatifs périphériques, les phénomènes de cicatrisation, qui se produisent avec une grande rapidité en tout point superficiel ou profond du parenchyme interne artificiellement exposé à l'air, sont la preuve évidente d'une activité vitale encore très appréciable de toutes les cellules de l'organe charnu.

Nous nous trouvions donc en présence d'un cas de parasitisme occasionnel (1) réalisé par une Mucorinée, qui, grâce à

régions où se fait cette culture, le soleil est encore chaud et la terre assez sèche, et laisser les racines se dessécher un peu sur le champ (trois ou quatre jours au moins); cette dessiccation partielle des tissus les plus superficiels — c'est précisément le parenchyme cortical, moins riche en amidon, qui est le plus tendre — aura pour effet, quitte à rider légèrement la surface de la patate, de la rendre beaucoup moins fragile. J'ai remarqué, en effet, que celles qui étaient restées étalées quelque temps sur des planches, au laboratoire, s'infectaient beaucoup moins facilement que des racines récemment extraites, dont le tissu cortical est encore gorgé de sucs et turgescents. On objectera peut-être que dans les pays situés, comme Buenos-Ayres, en bordure de la zone sub-tropicale, et où la chaleur est à peine suffisante pour ce genre de culture, les patates n'auraient pas atteint leur complète maturité; on pourrait alors ne récolter hâtivement que les tubercules destinés à l'ensilage et à la consommation pendant l'hiver, et laisser en terre le plus tard possible ceux destinés à la vente pendant les mois d'automne. On pourrait aussi, si de nouvelles observations démontraient l'utilité réelle de ce caractère, songer à sélectionner les racines très subérifiées que l'on rencontre parfois parmi les autres.

(1) Cet adjectif me paraît infiniment plus exact que celui de facultatif, ordinairement employé en pareil cas.

son caractère d'anaérobie facultatif, profite, pour envahir les tissus sains, des blessures contuses à cicatrisation lente.

J'ai voulu vérifier tout d'abord si ces phénomènes étaient spéciaux au *M. stolonifer* et à la patate. Voici les deux séries d'expériences que j'ai réalisées (1).

a) *Parasitisme du M. stolonifer vis-à-vis d'autres Phanérogames.*

Bien qu'il semble que dans les conditions naturelles la patate seule ait à souffrir du *Mucor*, j'ai ensemencé la mucédinée dans le vide, sur des rondelles de pomme de terre, de carotte, de navet et de betterave, avec un même nombre de gouttes d'une émulsion de spores provenant d'une culture sur patate stérilisée. Alors que les témoins exposés à l'air cicatrisaient normalement, les trois premières espèces étaient attaquées jusqu'à 1 centimètre de la surface dès le second jour (à l'étuve à 30 degrés), quoique d'une façon moins complète que les patates inoculées en même temps : les parenchymes étaient dissociés, sans odeur putride et montraient au microscope le mycélium caractéristique ; la rondelle de betterave restait intacte. Les résultats furent les mêmes chaque fois qu'on répéta l'expérience ; une seule fois, la betterave ayant glissé contre un fragment de patate énergiquement parasitée, a présenté une faible épaisseur de tissus dissociés. Des expériences ultérieures montreront que le même champignon peut attaquer aussi les topinambours et les feuilles charnues de *Agave americana*.

b) *Faculté parasitaire d'autres microorganismes pour la patate.*

Bien que, comme je l'ai dit, j'aie toujours observé, sur des centaines de racines naturellement attaquées, le seul *M. stolonifer*, j'ai reproduit les expériences ci-dessus d'abord avec d'autres espèces du genre *Mucor* ensemencées dans le vide. *M. mucedo* attaqua fort bien la patate, quoique moins énergiquement que *M. stolonifer*, et aussi, du reste, la pomme de terre, la carotte et le navet ; il respecta la betterave. J'ai obtenu

(1) Voici la technique à laquelle, après quelques tâtonnements, je me suis arrêté : la stérilisation extérieure des organes charnus se faisait par l'eau oxygénée à 10 p. 100 de la solution commerciale (bain d'une heure) ; on lavait ensuite par trempage dans l'eau stérile. Qu'il se soit agi de cultures aérobies ou anaérobies, chaque rondelle d'organes charnus était placée dans un verre de montre ou un petit cristallisoir de manière à l'isoler autant que possible (je n'employais de boîte de Petri fermée que dans des cas exceptionnels, ce procédé étant trop peu pratique lorsqu'il s'agit d'un grand nombre d'essais). Pour les cultures à l'air, les rondelles, dans leur cristallisoir, étaient rangées dans des cuvettes de porcelaine (24 X 18) dont le fond était occupé par un papier-filtre mouillé et qu'on recouvrait d'un verre à vitre. Tout ce matériel était stérilisé. Les ensemencements se faisaient toujours au moyen de quelques gouttes d'une émulsion dans l'eau de spores ou de bactéries, distribuées avec une pipette sur la surface des rondelles.

de même le parasitisme sur la batate avec un *Mucor* isolé sur excrément de chien (*Mucor caninus*? la culture, fragile sur milieu stérilisé, est morte avant que j'aie pu déterminer l'espèce).

Enfin, j'ai essayé le même procédé d'infection avec des bactéries pouvant végéter dans le vide et me suis adressé au *Bacillus coli communis* et au *B. fluorescens liquefaciens* employés déjà par E. Laurent (1) et par L. Lepoutre (2).

Je n'ai pu obtenir de la sorte l'attaque de la batate (je l'ai réalisée dans la suite par d'autres procédés), mais la pomme de terre, dès la première infection, fut profondément attaquée par le colibacille (culture sur gélose provenant d'excréments) : dès le second jour, une tache luisante apparaissait sur la surface ensemencée avec quelques gouttes d'une émulsion du bacille; le quatrième jour, le disque d'un centimètre d'épaisseur était transpercé. Le fluorescent, isolé de la terre, pénétra beaucoup moins, et l'attaque des carottes et navets était moins active et moins régulière, c'est-à-dire que, sans qu'on puisse dire pourquoi, le parasitisme se déclarait dans certains essais et pas dans d'autres. Les témoins exposés à l'air se cicatrisèrent tous.

Il y a donc là un procédé général d'infection puisque des microorganismes aussi différents que des bactéries et des *Mucor* peuvent, profitant de leur faculté de se développer sans air, attaquer dans le vide des disques d'organes charnus d'espèces très diverses, qui, dans les mêmes conditions, mais à l'air, leur opposeraient la barrière infranchissable des tissus en voie de cicatrisation.

Ces résultats rappellent étrangement ceux des auteurs précédemment cités, qui obtenaient des « races parasites » en ensemençant des bactéries banales sur des rondelles de tubercules préalablement trempées pendant une heure dans une solution à 1 p. 1000 de soude caustique; cela, il est vrai, dans des conditions particulières de nutrition des plantes phanérogames ou chez des variétés particulièrement réceptives. J'ai préparé de même trois séries de disques de batate, pomme de terre, carotte et navet, et ensemencé respectivement chaque série

(1) *Annales*, t. XIII, 1899, p. 1.

(2) *Annales*, t. XVI, 1902, p. 304.

avec des émulsions de *Mucor stolonifer*, *B. coli communis* et *B. fluorescens liquefaciens*; tous se cicatrisèrent pendant que les mêmes tubercules et racines, ensemencés avec les mêmes microorganismes, donnaient dans le vide les résultats énoncés plus haut. J'ai recommencé avec une solution alcaline à 2 p. 1000 (les disques étaient rapidement lavés à l'eau stérile avant l'inoculation); j'obtins par le *Mucor* une attaque rapide et complète de la batate, elle était moins énergique chez la carotte, dans les autres cas il y eut cicatrisation.

Ces résultats, en partie négatifs me paraissent aisément explicables par les différences considérables dans la résistance opposée aux parasites, observées par Laurent et Lepoutre chez des variétés différentes et selon l'alimentation ou l'état de maturité des organes charnus; je ne m'attardai donc pas à en chercher les causes, d'autant plus que j'avais obtenu par le procédé de la neutralisation, la pénétration du *Mucor*, qui seule m'intéressait, dans la batate et la carotte.

Il en résulte donc que, de même que le vide avait pu remplacer la neutralisation dans l'attaque de la pomme de terre par le coli, la neutralisation pouvait remplacer le vide dans celle de la batate par le *Mucor*. Comment expliquer dès lors l'action du bain de soude? M. Laurent, très tenté de l'attribuer à l'alcalinisation du suc cellulaire de l'hôte, — suc acide et par suite défavorable aux bactéries qu'il employait, mais nullement à la moisissure de mes expériences — faisait remarquer cependant que le degré d'immunité des diverses variétés de pomme de terre sur lesquelles il expérimentait, n'était nullement en relation avec le degré d'acidité de leur suc cellulaire, et d'autre part, que cette acidité n'était pas suffisante pour empêcher le développement saprophytique des mêmes bactéries dans le suc des mêmes organes crus, ou sur ces organes cuits. J'ai du reste fréquemment observé que la pulpe dissociée des batates, carottes et pommes de terre, restait acide, non seulement en présence du *Mucor*, mais aussi en présence du colibacille.

Les faits établis plus haut — parasitisme du coli à l'abri de l'air sur pomme de terre non alcalinisée, parasitisme sur batate neutralisée du *Mucor* que l'acidité ne gêne pas — me parurent diminuer si considérablement le rôle direct que l'on peut attribuer

à l'acidité, faible en général, du suc cellulaire, dans la défense contre les parasites, que j'ai cherché à réaliser l'infection par un procédé modifiant aussi peu que possible la composition des sucs de la plante et qui laissât pourtant les cellules et le parasite ensemencé au contact de l'air : j'ai eu recours à la plasmolyse des cellules superficielles de la blessure, par immersion dans une solution suffisamment concentrée de chlorure de sodium.

Dans une première expérience, des disques de patate et de pomme de terre, ensemencés respectivement dans la suite avec *Mucor* et colibacille furent mis à tremper pendant deux heures dans des solutions de 5, 7,5 et 10 p. 100 de sel de cuisine : l'infection se produisit énergiquement dans les trois rondelles de patate, moins active mais nette dans celles de pomme de terre. Dans la suite, j'ai toujours employé l'immersion pendant une heure dans une solution à 10 p. 100 stérilisée, suivie, avant l'ensemencement, d'un double passage dans l'eau, stérile aussi, toutes les précautions d'asepsie énumérées plus haut devant être prises dans ce cas pour éviter les infections spontanées, qui sont des plus aisées après ce traitement.

Ce procédé m'a donné des résultats positifs pour tous les organes charnus que j'y ai soumis : les rondelles de patate, pomme de terre, topinambour, navet, carotte, betterave, feuilles d'*Agave americana*, après avoir subi la plasmolyse des cellules superficielles de la blessure, se laissèrent infecter par *M. stolonifer* et par le colibacille, avec plus de régularité, et dans bien des cas avec plus d'intensité que par les procédés précédents : c'est le seul qui m'ait permis d'obtenir à coup sûr l'infection de la betterave, très résistante comme l'avait déjà vu Laurent, infection que réalise plus facilement encore, dans ces conditions, le *B. fluorescens liquefaciens*. Les témoins, plongés dans l'eau pure pendant un temps égal et ensemencés avec les mêmes émulsions microbiennes, étaient tous cicatrisés dès le second jour.

Mes expériences sur les altérations des organes charnus étaient presque terminées lorsque, en octobre 1912, M. Lizer, du laboratoire de Pathologie végétale du ministère de l'Agriculture, à Buenos-Aires, m'apporta des pommes de terre attaquées par *Fusarium Solani*. Comme il désirait faire des essais d'infection, je lui proposai d'essayer ma méthode de la plasmolyse. Après avoir obtenu une culture à peu près pure sur pomme de terre cuite, nous pûmes réaliser, avec la plus grande

facilité, la pénétration du *Fusarium*, après avoir ensemencé quelques gouttes d'une émulsion de spore sur des rondelles de tubercules immergés une heure dans la solution de NaCl à 40 p. 100 ; les témoins ensemencés de même, mais non traités, restèrent toujours intacts. Je n'ai pas eu le temps de pousser plus avant la recherche sur ce champignon, dont le caractère parasitaire est, à bon droit, très contesté.

Nous disposons donc de trois procédés artificiels nous permettant d'obtenir indifféremment, sauf quelques variations dans la résistance des divers hôtes aux divers parasites, la pénétration de moisissures et de bactéries dans les tissus vivants des organes charnus les plus divers.

Enfin, pour me rapprocher autant que possible des conditions naturelles de l'infection, j'ai réalisé les mêmes expériences en remplaçant l'action du vide, des solutions neutralisante ou plasmolysante, par celle du filtrat aseptique des organes pourris, filtrat étudié depuis de Bary par de nombreux expérimentateurs.

Comme on s'en souviendra, on a admis l'existence dans ces filtrats de deux principes : le premier est la diastase capable de dissoudre le ciment pectique qui unit les cellules dans les tissus des plantes, diastase que Laurent désigne par le terme vague de cytase, que j'avais appelée improprement pectinase dans un travail sur le rouissage aérobie du lin (1), mais à laquelle convient beaucoup mieux le nom de pectosinase, qu'on a donné dans la suite à la zymase capable de transformer les corps pectiques insolubles du type pectose en corps pectiques solubles encore mal connus ou même en composés plus simples ; le second, dont la nature est encore complètement inconnue, jouerait le rôle d'une toxine tuant ou tout au moins plasmolysant les cellules des tissus sains autour des tissus déjà attaqués et permettant ainsi, avec l'aide pour ainsi dire mécanique de la pectosinase, le passage rapide du parasite des cellules mortes aux cellules vivantes.

En raison de l'abondance avec laquelle elle donne un jus facilement filtrable, j'ai choisi la carotte, attaquée dans le vide par le *Mucor* et laissée trois jours à l'étuve à 27 degrés, pour la préparation de ce filtrat : la pulpe était comprimée dans un linge et le liquide recueilli, passé au filtre Chamberland sans

(1) *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* de Paris, t. CXXXIV, p. 4163.

y ajouter d'eau; le filtrat, qui s'est fort bien conservé stérile, était légèrement acide et dégageait une très légère odeur butyrique.

Après trempage pendant une heure dans le filtrat, des fragments des divers organes charnus des sept espèces ayant servi dans l'expérience précédente, ont tous été très énergiquement attaqués, tant par le *Mucor* que par le colibacille, dès le premier jour après l'ensemencement; la betterave seule mit trois jours à montrer une désorganisation évidente des tissus superficiels, désorganisation qui gagna lentement les couches profondes, mais dans ce cas, les tissus qui avaient subi l'action du filtrat, au lieu de se dessécher dès le premier jour et de se cicatriser comme dans les disques témoins, restèrent humides et comme fraîchement coupés.

Des morceaux de patate et de pomme de terre, laissés jusqu'au lendemain dans le filtrat, auquel quelques gouttes d'essence de girofle avaient été ajoutées pour empêcher l'invasion microbienne, se montrèrent profondément dissociés; la carotte parut moins sensible, le topinambour moins encore et la betterave, fait déjà signalé, ne l'était pas du tout.

Pour me rendre compte de l'activité de la propriété toxique du filtrat, j'ai répété l'expérience sur quelques-unes des espèces citées avec des dilutions au 1/2, au 1/4 et au 1/8 : les résultats accusèrent des résistances bien différentes selon les espèces parasitées et les espèces parasites :

Carotte : Attaque nette dès le 2^e jour par le *Mucor* et le coli après contact des dilutions au 1/2 et au 1/4; pour la dilution au 1/8, attaque douteuse par le *Mucor* le second jour, nette le 3^e; le coli ne pénètre plus.

Batate : Attaque légère, dans le tissu cortical plus sensible, après contact avec la première dilution, en présence du *Mucor*; tous les autres fragments se cicatrèrent.

Pomme de terre : Très légère attaque par le coli, après trempage dans la première dilution; rien dans les deux autres.

Betterave : Aucune attaque de la part du *Mucor*.

Chose curieuse, l'affaiblissement de la pectosinase dans les trois dilutions ne fut pas parallèle à celui de la propriété toxique, vis-à-vis des différentes espèces: la patate et la pomme de terre étaient encore dissociées dans la dilution au 1/8, la carotte ne l'était déjà plus dans la dilution au 1/4.

Comme d'autres auteurs, j'ai soumis le filtrat carotte-*Mucor* à l'action de diverses températures : 65, 75, 85 degrés pendant une heure, 100 et 120 degrés pendant une demi-heure, et j'ai répété les expériences ci-dessus. La pectosinase du *Mucor* comme celle du colibacille et celle du *Botrytis cinerea*, est détruite à une température inférieure à 65 degrés. La substance toxique résiste au contraire beaucoup plus, comme l'avait vu Laurent, mais j'observai des phénomènes d'atténuation analogues à ceux de l'expérience précédente. Ainsi la carotte est encore attaquée par

le *Mucor* et par le coli après contact d'une heure avec le filtrat chauffé à 120 degrés; chauffé à 75 degrés, le filtrat assure encore l'attaque complète de la patate par le *Mucor*; chauffé à 85, 100 et 120 degrés, il ne permet plus qu'une pénétration incomplète, et le chauffage à 65 degrés suffisait déjà à empêcher celle du coli. Ces faits m'ayant paru étranges, je recommençai l'expérience en disposant des témoins trempés les uns dans l'eau, les autres dans le filtrat frais, les rondelles provenant autant que possible des mêmes organes ou d'organes de même origine, pour m'assurer qu'il ne s'agissait pas de sensibilités ou de résistances individuelles extraordinaires : j'obtins toujours des résultats comparables entre eux.

J'ai voulu me rendre compte enfin des propriétés du précipité obtenu par l'alcool (deux parties d'alcool absolu pour une de filtrat), précipité abondant, séparé par centrifugation et redissous dans un volume d'eau égal à celui de la portion de filtrat dont il provenait : le liquide ainsi obtenu s'est montré, pour la patate et la carotte, en présence du *Mucor*, aussi toxique que le filtrat, mais avait perdu presque entièrement sa toxicité vis-à-vis de la pomme de terre (pas d'attaque par le coli, très faible attaque par le *Mucor*). Il dissociait par contre énergiquement, en milieu parfaitement neutre, — je n'y avais ajouté ni acide ni base, — les tissus de ces trois espèces et respectait ceux de la betterave.

Des expériences analogues, mais beaucoup moins complètes, ont été faites avec des filtrats patate-*Mucor*, pomme de terre-coli et betterave-*Mucor* (dans ce cas il y avait eu infection par de nombreuses bactéries) : ils ont permis de même à des degrés divers d'intensité, d'obtenir l'infection d'organes charnus d'autres espèces, par le *Mucor* et par le colibacille.

L'INTERPRÉTATION DES PHÉNOMÈNES

Je considérerai successivement les deux facteurs essentiels de tout phénomène d'infection : la réceptivité de l'hôte et la virulence du parasite.

Pour ce qui est du premier point, nous avons vu que cinq procédés distincts — contusion, vide, alcalinisation, plasmolyse, contact du tissu avec le suc d'organes altérés (et l'on pourrait

certainement en imaginer d'autres) (1) — permettent d'obtenir indifféremment la pénétration d'organismes divers dans les organes charnus de végétaux très différents. Il semble donc que les modes d'action de ces procédés prédisposants doivent être très semblables entre eux et tout à fait indépendants de la nature spécifique de l'hôte comme celle du parasite, et il n'est en tout cas pas possible de voir dans la neutralisation du suc cellulaire une condition nécessaire pour conférer des propriétés parasitaires à des bactéries saprophytes.

Une conséquence en tout cas paraît commune à tous ces procédés, qu'ils soient mécaniques, physiques, chimiques ou biologiques, c'est qu'ils débilitent considérablement, s'ils ne la détruisent pas, la vitalité des cellules saines les plus superficielles de la blessure par où se fera l'infection, blessure dont la cicatrisation est ainsi retardée ou même tout à fait empêchée. Or il est bien connu que le premier phénomène cicatriciel est la subérisation de la partie externe des membranes des cellules saines limitant la plaie, subérisation par laquelle la plante reconstitue une sorte de cuticule imperméable sur les tissus mis à nu. Il fallait donc vérifier histologiquement si cette subérisation était réellement empêchée par les procédés artificiels permettant l'infection.

Des séries de rondelles de patate, pomme de terre, carotte et betterave furent, immédiatement après leur préparation, l'une maintenue dans le vide, les autres trempées une heure, respectivement dans le filtrat carotte-*Mucor*, une solution de NaCl à 10 p. 100, une lessive de soude à 1 p. 1000, puis laissées vingt heures à l'étuve à 27 degrés dans les conditions ordinaires de mes expériences, de même que des témoins, les uns immergés une heure dans l'eau, les autres n'ayant subi aucun traitement. La subérisation a été recherchée dans des coupes pendiculaires aux surfaces blessées, après coloration par le vert d'iode qui, comme on le sait, colore le suber et le ligneux sans colorer la cellulose pure. Voici comment j'opérais : une fois les cellules vidées par l'hypochlorite de Na, les coupes, soigneusement lavées, étaient laissées à tremper toute une nuit dans une solution extrêmement faible de vert d'iode, une eau si peu teintée que le lendemain elle était entièrement décolorée par la fixation totale du colorant. On obtient ainsi, sans devoir recourir à des décolorations par l'alcool, toujours dangereuses, des préparations dont les membranes normales (de cellulose pure) sont restées incolores et où seuls apparaissent d'un vert bleuâtre intense, les vaisseaux, dont quelques-uns traversent presque toujours la coupe et les parties subérifiées.

(1) J'ai obtenu l'attaque de la carotte et de la pomme de terre par le *Mucor*, après trempage d'une heure dans l'acide butyrique au 1/200 normal ; le colibacille ne s'est pas développé dans ces conditions.

Alors que les coupes des témoins montraient déjà à l'œil nu, sous forme d'un mince liséré vert, la partie la plus externe des membranes des cellules mises à nu, fortement colorée, le réactif n'accusait aucune subérisation dans les tissus conservés dans le vide (même après quarante-huit heures) ni dans ceux baignés dans le filtrat ou dans la solution salée. Un peu de subérisation s'était produite par place dans les fragments baignés dans la soude : il est probable néanmoins qu'un bain plus long ou un peu plus concentré l'eût empêchée tout à fait, et le fait explique les difficultés que j'ai rencontrées, dans les conditions où je travaillais, à réaliser l'infection par ce procédé.

On est donc autorisé, me semble-t-il, à ne voir dans les différents procédés employés dans ces expériences pour obtenir l'infection, que des moyens divers d'empêcher la cicatrisation des tissus blessés, conclusion que rend très admissible l'importance capitale reconnue depuis longtemps aux blessures dans de nombreuses maladies parasitaires des végétaux supérieurs.

Mes expériences, infiniment moins complètes sous ce rapport que celles de M. E. Laurent, n'apportent aucun renseignement sur la question de la résistance des diverses variétés, — j'en ai constaté aussi les variations, notamment chez la pomme de terre, — ni surtout sur l'influence de l'alimentation minérale de la plante, ni sur celle de l'état de maturité de l'organe considéré. Il y a deux façons d'expliquer ces différences, soit par des variations dans la composition chimique entraînant des variations du chimiotaxisme du microorganisme, soit par des variations dans l'activité de la subérisation. J'ai déjà rappelé les curieux résultats que Laurent avait obtenus en étudiant l'acidité du suc dans des variétés plus ou moins résistantes, acidité qui ne peut donc pas être invoquée; il me semble de même difficile de parler de chimiotaxisme lorsqu'il ne s'agit, d'une part, que de faibles différences de composition chimique, comme celles existant entre des variétés d'une même plante cultivée, et d'autre part, d'organismes aussi omnivores que ceux dont il s'agit dans ces expériences : ne voit-on pas en effet *Mucor stolonifer* prospérer sur les fruits mûrs les plus divers, et E. Laurent lui-même n'a-t-il pas dressé dans son travail de longues listes de substances tertiaires et quaternaires dont le *B. coli* et le *B. fluorescens liquefaciens* peuvent s'accommoder

comme unique aliment organique? A plus forte raison, dans ses remarquables expériences où les plantes, dont les organes charnus étaient ensuite soumis aux épreuves du parasitisme, avaient reçu des quantités considérables de divers engrais chimiques, il semble difficile d'admettre que de faibles quantités en plus ou en moins de K, Ca, N ou Ph, éléments existant toujours dans le suc cellulaire en quantités plus que suffisantes pour les bactéries, puissent exercer des actions chimiotaxiques aussi puissantes ou même exercer une action directe considérable sur le développement des microorganismes.

Il eût, par contre été des plus intéressant, dans les organes ainsi préparés, d'étudier la vitesse de la cicatrisation, vitesse sur l'importance de laquelle nous reviendrons par la suite : peut-être des modifications, même légères, dans la composition minérale du suc cellulaire, peuvent-elles exciter ou retarder l'activité synthétique du protoplasme dans les phénomènes chimiques fort complexes de la subérisation; mais de telles différences s'admettront encore bien plus facilement dans le cas de variétés, voire d'espèces différentes, chez lesquelles la production du suber normal présente souvent des variations considérables; il semble donc qu'on pourrait dans certains cas n'attribuer qu'à des différences dans l'activité de la subérisation, celle qu'on observe dans la résistance aux parasites de blessures.

Néanmoins, ce n'est pas seulement dans des cas semblables, par exemple, à celui de la betterave, où des solutions de 40,45 ou 18 p. 100 de saccharose sont évidemment défavorables au développement de nombreux microorganismes, que les faits de chimiotaxisme — et d'un chimiotaxisme infiniment plus délicat sans doute que celui mis en évidence par les expériences de Massee dont je reparlerai plus loin — gardent tout leur intérêt : ils restent, au contraire, les seuls à nous donner actuellement une explication de la spécificité des véritables parasites des végétaux, Péronosporées, Urédinées, Ustilaginées par exemple, et même de celle, plus ou moins établie, de ces innombrables champignons saprophytes que les mycologues nous décrivent vivant dans les tissus morts, particulièrement dans le parenchyme cortical des rameaux desséchés de la plupart des Phanérogames.

Seulement il résulte pour moi, de tout ceci, et ce sera une

des conclusions de ce travail, qu'on n'est pas autorisé, comme il semble bien qu'on ait été trop tenté de le faire, à généraliser, à étendre aux phénomènes intimes du parasitisme proprement dit, les faits, infiniment plus simples sans doute, observés dans ce qu'on est convenu d'appeler le parasitisme de blessure.

Le second point à interpréter est la virulence du parasite.

On peut se demander si, dans tous les cas dont il a été question jusqu'ici, il y a réellement virulence, ou plutôt acquisition de virulence, ce qui implique naturellement un changement réel des propriétés de l'organisme envahisseur, et si vraiment il se produit des races parasites.

Avant d'aller plus loin, je ne puis m'empêcher de faire remarquer encore une fois combien les résultats de certaines de mes expériences sont semblables à ceux obtenus il y a bientôt quinze ans par mon regretté maître M. Emile Laurent, que ce sont ceux-ci qui ont inspiré celles-là, et que je ne puis avoir un instant l'intention de contester des faits que mes observations tendent au contraire à généraliser. Ce sont donc uniquement certaines interprétations, qu'en commençant ces recherches, il y a plusieurs années déjà, je croyais simplement confirmer, que des faits nouveaux m'ont amené à discuter ici.

Je rappellerai donc que Laurent et Lepoutre n'ont jamais obtenu l'attaque des organes charnus non alcalinisés, qu'en inoculant, en beurrant en quelques sorte, les surfaces blessées, comme je le leur ai maintes fois vu faire, avec des quantités très appréciables de la pulpe d'un organe pourri. Les essais d'infection avec les mêmes microbes provenant de cultures en milieu stérilisé échouèrent toujours : les auteurs interprètent ces faits en disant qu'il y a production de races parasites de plus en plus virulentes par passages successifs sur organes alcalinisés, puis sur organes non traités, et perte de la virulence acquise de la sorte, par un seul passage sur milieu non vivant. Ce serait donc un cas de pléomorphisme des plus accusés, pléomorphisme auquel, comme on se le rappellera, on croyait beaucoup plus il y a quinze ou vingt ans qu'on ne le fait aujourd'hui.

Dans toutes mes expériences, j'ai toujours observé, quel qu'ait été le traitement infligé au tubercule pour obtenir la pénétration première du microbe, que le parasitisme par le procédé d'inoculation employé par Laurent s'obtenait dès le

premier passage, le microbe n'ayant été que trois ou quatre jours, au maximum, en contact avec son nouvel hôte, et même en général en passant d'une espèce phanérogame à une autre, c'est-à-dire qu'une pomme de terre beurrée avec de la pulpe batate-*Mucor* (1) était attaquée par le champignon, de même que de la pulpe pomme de terre-coli pouvait déterminer la pourriture de la carotte. Dès le début, je me suis rendu compte que dans les conditions où j'opérais les progrès du parasitisme par passages successifs étaient à peine sensibles, ce pourquoi, dans toutes les expériences rapportées plus haut, par souci d'opérer toujours avec les mêmes cultures certainement pures, j'employais toujours, pour l'inoculation, des cultures fraîches sur gélose pour le coli, et sur batate cuite pour le *Mucor*, cultures qui provenaient elles-mêmes de cultures identiques; le *Mucor* provenait originairement d'une batate malade, mais le coli n'avait, lui, jamais passé sur milieu végétal vivant.

A propos de l'acquisition et de la perte de la virulence, je crois intéressant de rappeler ici que dans les expériences de G. Massee (2), qui procédait par injection, sous l'épiderme de l'organe où l'ensemencement du microbe se faisait dans la suite, de solutions pour lesquelles celui-ci présentait un chimiotaxisme positif énergique, il fallut douze passages sur *Begonia* préparés par une solution de saccharose, pour transformer le saprophyte *Trichothecium candidum* en parasite vrai, et l'expérience avait duré douze semaines; et vingt et un passages du parasite *Cercospora melonis* sur *Oncidium* préparé par injection du suc de concombre, pour obtenir qu'il se développât sans préparation préalable; l'infection se faisait sans blessure de l'épiderme, avec une émulsion dans l'eau de conidies prises, dès le second passage, sur la plante antérieurement parasitée. Massee, qui semble ne pas avoir connu les travaux de Laurent et Lepoutre, ne rapporte malheureusement aucune expérience

(1) Il faut pour cela que le *Mucor* ait eu le temps de sporuler et que la pulpe servant au nouvel ensemencement contienne des spores, ce qui est du reste le cas général lorsqu'il s'agit d'infection sur rondelles, à l'air libre. Au contraire, au début surtout de l'infection, la pulpe de batate naturellement attaquée ne contient pas de spores, puisque le plus souvent le champignon ne fructifie qu'assez tard et dans les fentes seulement de la pellicule subéreuse, ce qui explique l'échec de mes premiers essais d'infection.

(2) *Philosoph. Transact. Royal Soc. of London*, série B, vol. CXCVII (1904), p. 7-24.

sur la perte de la virulence des parasites ainsi obtenus. Il y a évidemment ici acquisition d'une propriété parasitaire, d'une virulence donc, que ces champignons ne possédaient pas au début de l'expérience, mais on remarquera que les passages furent beaucoup plus nombreux et le contact du microorganisme avec le nouvel hôte incomparablement plus long que dans les expériences dont nous nous sommes occupés jusqu'ici.

Dans le cas des racines et tubercules au contraire, il n'y a, d'après moi, aucune modification dans les propriétés des microbes envahisseurs. En effet, on peut donner la virulence à des cultures n'ayant jamais passé sur milieu végétal vivant en les inoculant sous forme d'émulsion dans un filtrat carotte-*Mucor* très actif (1), et il n'est pas nécessaire, d'autre part, de faire passer les « races parasites » sur milieu stérilisé, pour leur faire perdre cette apparente « virulence »; il suffit, comme on va le voir, de les laver :

De petites quantités de pulpe de carotte, de pomme de terre ou de batate attaquées soit par le coli, soit par le *Mucor*, étaient émulsionnées dans quelques centimètres cubes d'eau, puis centrifugées; le liquide surnageant éliminé, on les réémulsionnait une seconde fois dans l'eau pour les recentrifuger, et répétait cette opération deux ou trois fois encore : les pulpes ainsi lavées, qui sont loin d'être stériles pourtant, inoculées sur des disques d'organes charnus dont elles auraient, avant le lavage, provoqué la pourriture, ne sont plus capables d'y déterminer la moindre altération : le tissu se cicatrise sous la pulpe, que l'on trouve le lendemain desséchée à la surface du disque parfaitement sain. Mais si à la pulpe lavée on ajoutait quelques gouttes d'un filtrat actif, il y avait attaque des tissus, moins énergique pourtant que dans le cas des pulpes non lavées, différence attribuable soit à la diminution considérable du nombre des germes par les centrifugations successives, soit à un affaiblissement de la toxicité des sucs par filtration.

Il faut, au sujet de ces expériences, ajouter quelques recommandations nécessaires, surtout si l'on expérimente sur la carotte, particulièrement facile à attaquer; il ne faut pas que la couche de pulpe soit épaisse, ni trop mouillée, sans quoi elle agirait comme les tissus contus des infections naturelles de la batate, et j'ai pu obtenir l'infection par le *mucor*, en ensemençant des spores dans une couche un peu épaisse de

(1) C'est de la sorte que j'avais d'abord essayé d'opérer pour démontrer la toxicité des filtrats, mais les quantités en contact avec les tissus sont forcément fort petites et les résultats sont irréguliers, ce qui m'obligea à recourir à la méthode des trempages.

pulpe de carotte saine cuite, répandue à la surface d'un disque de carotte. Il est d'autre part utile d'écraser soigneusement les pulpes entre deux lames de verre avant les premiers lavages, afin de détruire davantage les cellules, et de les laisser ensuite quelques minutes en suspens dans l'eau avant les centrifugations successives; l'élimination des principes toxiques est ainsi mieux assurée. Même en prenant ces précautions, l'opération ne dure guère plus d'une demi-heure, et il ne peut être question d'un affaiblissement des microorganismes par un trop long séjour dans l'eau.

En dehors donc d'une certaine accoutumance à un nouveau milieu de culture, comparable à ce qu'on observe couramment pour les milieux inertes, et qui peut évidemment se produire dans le cas qui nous occupe, il semble que rien ne change dans les propriétés des saprophytes considérés au moment où, occasionnellement, ils réussissent à pénétrer dans des tissus vivants dont la composition chimique leur est favorable : seule la cicatrisation rapide des blessures leur en barrait l'entrée, mais toute circonstance empêchant ou retardant suffisamment cette cicatrisation — et nous savons combien diverses elles peuvent être — leur permettra d'y pénétrer. Le parasitisme de blessure ne dépend donc que du résultat d'une véritable course entre la multiplication des microbes dans la couche des cellules blessées incapables de se défendre, et la subérisation des membranes des cellules saines, situées immédiatement en dessous.

Les circonstances favorables ou défavorables à l'un ou l'autre de ces phénomènes pouvant, en intensité surtout, varier à l'infini, la victoire de l'un ou l'autre des antagonistes dépendra, dans chaque cas, de facteurs souvent très divers, et cela permet de comprendre aisément les différences observées par les auteurs dans la résistance des organes charnus mis en expérience, suivant l'état physiologique, la variété ou le régime alimentaire antérieur de la plante, de même que les résultats, capricieux en apparence, de certains de mes essais où l'on faisait varier tour à tour l'hôte, le parasite et les procédés propres à empêcher la cicatrisation.

Quant au rôle apparemment spécifique joué dans l'affection des batates par *Mucor stolonifer* dans les deux Amériques, il

n'oblige pas, me semble-t-il, à reconnaître un caractère parasitaire à l'affection produite : il s'explique fort bien, étant donnée surtout l'extrême abondance de cette moisissure, par des préférences nutritives dont on pourrait citer bien des exemples dans des cas d'indiscutable saprophytisme : *Botrytis* sur raisin, *Penicillium glaucum* sur citron, etc.

Il nous reste enfin à nous occuper des propriétés toxiques des filtrats d'organes pourris.

Nous avons vu que ces propriétés ne sont pas spécifiques, ni par rapport au microorganisme, ni par rapport à l'hôte; qu'elles s'affaiblissent considérablement par divers procédés — dilution, précipitation par l'alcool, chauffage — mais quelles ne disparaissent pas entièrement, même par un chauffage à 120 degrés, et que, d'autre part, des filtrats préparés autant que possible dans les mêmes conditions — culture d'un même microorganisme sur un même organe charnu — montrent parfois des activités très différentes.

Plusieurs de ces faits tout au moins seraient bien difficiles à expliquer si l'on supposait la présence dans les filtrats d'une substance toxique définie sécrétée par le microbe, auquel elle devrait alors conférer une virulence dont nous n'avons pas trouvé trace; ils sont au contraire des plus faciles à comprendre si l'on admet que les propriétés toxiques sont dues au mélange dans les filtrats, des divers produits de désassimilation résultant de la vie du microorganisme aux dépens des albumines protoplasmiques et des substances en solution dans le suc cellulaire des parenchymes envahis, mélange dont la composition peut varier d'une expérience à l'autre, dont quelques constituants — des acides organiques par exemple — sont très résistants à la chaleur et d'autres beaucoup moins, et dont certains même peuvent être précipitables par l'alcool. Dans les conditions naturelles, pour qu'un microorganisme disposant d'une pectosinase puisse pénétrer dans un tissu végétal vivant, constituant pour lui un milieu de culture favorable, il faut donc que des substances toxiques pour l'hôte résultent de son développement dans les cellules superficielles blessées et qu'elles soient produites en quantité suffisante pour empoisonner les cellules saines sous-jacentes, avant que celles-ci aient pu constituer la barrière subéreuse capable de les protéger.

Cette manière de voir explique fort bien que l'infection ne soit pas possible par une plaie de coupure exposée à l'air, mais qu'elle se produise au contraire par cette même plaie dans le vide où la subérisation ne peut se faire, et de même, que les blessures contuses ou des couches de cellules intoxiquées ou simplement plasmolysées, soient des portes d'entrée des plus favorables.

J'avais cru pouvoir vérifier cette hypothèse en faisant agir sur des tissus vivants un filtrat d'organe tué par la chaleur et envahi ensuite par un microbe : un filtrat de *carotte cuite-Mucor* se montra infiniment moins toxique que le filtrat *carotte crue-Mucor*. Je ne crois pas pourtant qu'on puisse en tirer un argument contre ma manière de voir et attribuer à l'inutilité pour le parasite de sécréter une toxine en présence de tissus morts, la presque inactivité des filtrats d'organe tués par la chaleur (stérilisation à 100 degrés). En effet — et il est étrange que le fait n'ait pas attiré davantage l'attention — le développement du *Mucor* comme des bactéries, est infiniment plus faible sur organe cuit que sur organe cru, et l'altération du substratum, absolument incomparable dans les deux cas : ainsi la culture bien connue de colibacille sur pomme de terre stérilisée, avec son mince revêtement fort peu visible sur la surface des fragments de tubercule, ne ressemble en rien à l'intense et rapide putréfaction transformant tout le parenchyme amylacé en une masse visqueuse à odeur fécaloïde, que le même microbe déterminerait sur un autre fragment du même tubercule cru traité selon l'une des méthodes — la plus simple et la plus efficace est la plasmolyse — dont il a été parlé plus haut. Dans ces conditions, les résidus de l'assimilation sont forcément dans le premier cas, non seulement moins abondants, mais sans doute fort différents, ce qui explique sans difficulté la faible toxicité des filtrats d'organes cuits.

CONCLUSIONS.

I. Dans la République Argentine, comme dans l'Amérique du Nord, la pourriture des batates, au cours de l'hiver, est causée par *Mucor stolonifer* Erbg. L'infection, qui se produit avec une extrême facilité au niveau des blessures contuses, est

impossible lorsque les tissus sains sont au contact direct de l'air (cas de coupures), la cicatrisation étant alors trop rapide. D'autres *Mucor* peuvent expérimentalement produire des altérations analogues.

II. Tout moyen empêchant la subérisation des membranes des cellules saines contiguës à la zone blessée mise à nu (maintien à l'abri de l'air, plasmolyse ou intoxication de ces cellules), permet l'infection immédiate des tissus vivants d'organes charnus divers (racine, tubercules, feuilles) par des champignons et bactéries saprophytes capables d'y trouver une alimentation leur convenant et de sécréter une pectosinase appropriée, cela sans qu'une période d'accoutumance soit nécessaire et sans que ce parasitisme occasionnel fasse acquérir aucune *virulence* au microorganisme envahisseur.

II. Le filtrat aseptique d'organes envahis dans de telles conditions est toxique pour les tissus sains et constitue un des moyens capables d'empêcher la subérisation des membranes, moyens dont il a été question ci-dessus. Cette toxicité qui se retrouve affaiblie dans le précipité obtenu par l'alcool, s'atténue par la chaleur sans disparaître complètement à 120 degrés, et n'est spécifique ni par rapport à l'hôte, ni par rapport au micro-organisme, ce qui rend difficile à admettre l'existence d'une toxine sécrétée par celui-ci, et permet au contraire d'attribuer la toxicité constatée aux produits de désassimilation résultant de la vie du microbe aux dépens du contenu des cellules des parenchymes altérés.

IV. Le parasitisme de blessure — rubrique sous laquelle peuvent être rangés peut-être tous les parasitismes occasionnels — dépend du résultat d'une course entre le développement du saprophyte (*Mucor-Fusarium*, bactéries) dans la couche superficielle des cellules blessées sans défense, et la subérisation des membranes des cellules saines immédiatement sous-jacentes, subérisation que peuvent empêcher les résidus des premières manifestations vitales du saprophyte, s'ils atteignent assez tôt un degré de toxicité suffisant.

SUR LA DIALYSE DE LA MALTASE

par W. KOPACZEWSKI.

La dialyse des diastases a été souvent l'objet de recherches spéciales, mais les résultats obtenus, en majeure partie, n'étaient point concordants. Ainsi, par exemple, Preti [1] avance que l'amylase de la takadiastase est indialysable à travers des membranes de collodion, tandis que Lévy [2], en employant aussi des sacs en collodion, trouve qu'elle passe complètement. Ces discordances viennent de ce que les auteurs n'ont pas tenu compte des grandeurs des micelles des diastases d'une part, et des grandeurs des pores des membranes utilisées de l'autre, en employant les membranes de perméabilité différente. Si on filtre sous une pression de 7 à 8 cent. une solution d'or colloïdal rouge, préparé d'après la méthode de Zsigmondy [3], à travers des filtres en collodion, acidifié par l'acide acétique, on voit que le liquide qui passe est parfaitement incolore, tandis que l'hémoglobine du sang de mouton traverse le filtre fortement colorée; la solution à 2 p. 100 de la maltase de takadiastase ne perd rien de son pouvoir hydrolysant vis-à-vis du maltose après avoir traversé la membrane. Si, maintenant, au lieu de collodion acidifié on emploie le collodion ordinaire à 6 p. 100, on voit que les solutions d'or colloïdal rouge et de maltase sont retenues, tandis que l'hémoglobine traverse le filtre encore faiblement colorée. Du reste, les expériences beaucoup plus complètes de Bechhold [4] confirment qu'en général la réaction du milieu, les grandeurs des micelles des colloïdes et des pores des membranes filtrantes ou dialysantes jouent un rôle très important dans la filtration et la dialyse des colloïdes.

En ce qui concerne la dialyse de la maltase, nous ne connaissons qu'un travail à ce sujet, celui de Bierry [5]. Cet auteur a trouvé que la dialyse pendant vingt-quatre à trente heures inactive la maltase du suc pancréatique, qu'on peut la réactiver par addition d'électrolytes, et qu'après une dialyse plus prolongée la maltase a disparu.

Etant données les idées de G. Bertrand sur la nature des diastases, il était naturel d'employer la dialyse simple, ou le procédé de dialyse électrique de Dhéré [6], appliqué avec tant de succès par MM. Lisbonne et Vulquin (*Archives de Physiol.*, 1913, n° 4) pour l'amylase, pour comprendre le rôle joué par les électrolytes dans l'hydrolyse du maltose par la maltase, et pour déceler la nature de ces électrolytes.

Comme maltase, nous avons employé la maltase de kôji (la takadiastase de commerce). Elle présente une réaction faiblement acide au tournesol, alcaline à l'héliantine : il faut 9,7 cent. cubes d'acide sulfurique 1/100 N pour obtenir le virage au rouge de l'héliantine, avec 0,2 gramme de takadiastase. La takadiastase possède un pouvoir réducteur propre assez élevé, savoir — 20 milligrammes de la takadiastase réduisaient 17,9 milligrammes d'oxydure de cuivre; 20 milligrammes du maltose — 22,1 milligrammes, le rapport est de 81,3 p. 100 de celui du maltose employé; autrement dit, ce pouvoir réducteur correspond à 78 p. 100 du sucre, exprimé en maltose. Le produit, desséché dans l'exsiccateur jusqu'à poids constant, possédait la composition suivante :

H ² O à + 110 degrés centigrades	5,65 p. 100
Matières organiques.	88,25 —
Cendres.	6,10 —

Dans les cendres les éléments prépondérants étaient : le magnésium — 15,9 p. 100 à l'état de phosphates; le calcium — 2,87 p. 100; le fer — 0,67 p. 100; l'acide phosphorique — 5,42 p. 100 (calculé en P²O⁵).

La takadiastase est presque entièrement soluble dans l'eau; toutefois, par une double filtration sur le papier Berzélius on lui enlève 7,16 p. 100 de matières solides. Abandonnée à la lumière, la solution de takadiastase noircit, mais son pouvoir hydrolysant augmente considérablement.

Comme maltose, nous nous sommes servi du produit commercial, purifié par nous. Une solution à 15 p. 100 de maltose commercial était précipitée par le double volume d'alcool absolu, décolorée par du noir animal exempt de cendres, et deux fois récrystallisée dans l'eau. Le produit ainsi obtenu possédait un pouvoir réducteur égal, aux erreurs d'expérience près, à celui indiqué par G. Bertrand [7] et un pouvoir rotatoire $A_D = + \frac{4,0 \text{ p. 100 cent. cubes}}{4,0 \text{ gr. 3d}}$ = + 133,3 à + 22 degrés centigrades. Malgré tous nos soins dans la déminéralisation du noir animal, nous avons retrouvé dans notre maltose 0,072 p. 100 de cendres.

Les solutions de la maltase et du maltose étaient préparées avec de l'eau redistillée (1), saturée de toluène. La maltase était à la concentration de 0,5 à 1 p. 100, le maltose de 1 p. 100 à 2 p. 100 (concentrations finales).

La dialyse était effectuée de la façon suivante : les sacs en collodion (2) de 30 centimètres de longueur et 15 millimètres de diamètre, ont été fixés au moyen de collodion riciné sur un manchon en verre d'éna, plongés dans un dispositif destiné à faire circuler de l'eau, arrivant par le haut, chauffés dans un autoclave 15 minutes à + 115 degrés centigrades. On les remplissait avec la solution de takadiastase à 1 p. 100 et on les abandonnait vingt-quatre heures pour imprégner la membrane et éviter ainsi les erreurs possibles, dues à l'absorption [4], puis cette solution a été rejetée. Les dialyseurs ainsi traités étaient prêts à servir. On les remplissait avec la solution de maltase à 2 p. 100, additionnée de toluène, préalablement filtrée deux fois sur papier Berzélius, et on dialysait vis-à-vis d'un courant d'eau redistillée, chargée de toluène.

Pendant la dialyse, le volume primitif du liquide intérieur augmente toujours d'environ 4,8 à 6,7 p. 100 pour la solution à 2 p. 100 de maltase et jusqu'à 20 p. 100 pour la solution à 1 p. 100. Pour étudier l'influence de cette dilution sur le pouvoir hydrolysant de la maltase, nous avons fait quelques expériences, dont voici les résultats (tableau I) :

TABLEAU I.

Température + 40 degrés centigrades.

N ^{os}	CONCENTRATIONS en maltase (finales) p. 100.	PROPORTION DE MALTOSE HYDROLYSÉE POUR 100 AUX CONCENTRATIONS (FINALES) DE			
		0,5 p. 100		1,0 p. 100.	
		Hydrolyse 3 h. 1/2.	Hydrolyse 7 heures.	Hydrolyse 3 h. 1/2.	Hydrolyse 7 heures.
1	0,10 p. 100	34,1 p. 100	51,1 p. 100	10,7 p. 100	21,6 p. 100
2	0,25 p. 100	29,3 p. 100	48,9 p. 100	19,0 p. 100	51,1 p. 100
3	0,50 p. 100	26,5 p. 100	42,2 p. 100	20,1 p. 100	54,1 p. 100
4	1,00 p. 100	34,4 p. 100	42,8 p. 100	24,8 p. 100	41,8 p. 100
5	2,00 p. 100	20,3 p. 100	23,7 p. 100	34,1 p. 100	45,3 p. 100

(1) L'eau redistillée, dont on se sert au laboratoire de M. G. Bertrand pour les recherches délicates, était l'eau distillée ordinaire redistillée dans le vide à la température + 30 à 40 degrés centigrades et possédait une conductivité de 1,6 à 2,4.10⁻⁶.

(2) Trois couches de collodion, obtenu en dissolvant 50 grammes de coton nitrique dans 600 parties d'alcool absolu et 400 parties d'éther sulfurique.

On voit que la dilution de 100 p. 100 de la maltase provoque, dans la concentration employée, une diminution de 7,9 p. 100 du pouvoir hydrolysant; donc une dilution de 20 p. 100 provoque une diminution d'environ 1,6 p. 100 de l'activité de la maltase.

Toutes les vingt-quatre heures on faisait une prise de 5 cent. cubes de liquide et on rétablissait l'égalité de niveau des liquides; on diluait cette prise dans le même volume d'eau et on mélangeait avec 10 cent. cubes de la solution de maltose à 1 p. 100 ou 2 p. 100. On partageait alors le mélange en deux portions: l'une servait de témoin, en arrêtant l'hydrolyse par une goutte de soude à 36°B.; l'autre était placée dans un thermostat, réglé de + 39 à 40,5 degrés centigrades, et abandonnée trois heures et demie.

Les sucres ont été dosés par la méthode de G. Bertrand [7], la proportion du maltose hydrolysé, calculée par la méthode indiquée par Porcher [8]. L'erreur totale, due aux dosages de sucre, calcul de la proportion du maltose hydrolysé, dilution du liquide dialysé, n'était pas supérieure, dans nos expériences, à + 4 p. 100.

Voici les résultats obtenus (tableau II) :

TABLEAU II.

Maltose 5 p. 100 (conc. fin.); maltase 1 p. 100 (conc. fin.);
durée d'hydrolyse 3 h. 1/2, température + 39°5 centigrades.

N ^{os}	TEMPS de dialyse.	MATIÈRES solides de la maltase p. 100.	CENDRES de la maltase p. 100.	POUVOIR réducteur propre de la maltase.	ALCALINITÉ à l'héliantine exprimée en $\frac{\text{SO}^+\text{H}^-}{100}$ N pour 0,2 gr. de maltase.	PROPORTION du maltose hydrolysé p. 100.
1	0 heure	92,84	6,40	81,3	9,7 c. c.	30,4
2	24 heures	—	—	—	—	100 »
3	48 heures	—	—	—	—	95,7
4	72 heures	—	—	—	—	85,6
5	96 heures	5,10	1,46	0,0	1,1 c. c.	85,9

On voit donc que tout d'abord le pouvoir hydrolysant de la maltase augmente par la dialyse de plus du double après vingt-quatre heures et se maintient aux environs de 180 p. 100 au

bout de quatre-vingt-seize heures de dialyse. En même temps les matières réductrices disparaissent.

Il est très intéressant de constater que par la dialyse 94,5 p. 100 des matières solides et 74,4 p. 100 des cendres sont enlevés. On voit que l'activité diastasique est liée à une très petite quantité de matière; en effet, après la dialyse, 0,25 milligramme de maltase sont capables d'hydrolyser 400 fois leur poids de maltose.

Il résulte de cette série d'expériences que la dialyse dans ces conditions n'aboutit pas à l'inactivation de la maltase. Nous avons donc essayé d'augmenter la perméabilité de la membrane en ajoutant de l'acide acétique au collodion, toutes conditions étant égales d'ailleurs. Voici les résultats obtenus, comparés avec les précédents (tableau III) :

TABLEAU III.

Maltose, 0,5 p. 100 (conc. fin.); maltase, 1 p. 100 (conc. fin.);
durée d'hydrolyse 3 h. 1/2; température + 39 degrés centigrades.

N ^{os}	TEMPS de dialyse.	PROPORTION DE MALTASE HYDROLYSÉE P. 100	
		Membrane acidifiée.	Membrane ordinaire.
1	0 heure	27,4	27,4
2	24 heures	66,1	100,0
3	48 —	59,7	97,4
4	72 —	48,3	96,0
5	96 —	38,0	91,8

On voit que la maltase perd lentement son pouvoir hydrolysant, quand on la dialyse dans les sacs de collodion acidifiés. Mais en vérifiant les eaux de dialyse, réunies et concentrées dans le vide à + 35 degrés centigrades, nous avons observé que la partie de la maltase qui traverse la membrane acidifiée possède une activité hydrolysante assez accentuée, tandis qu'elle est parfaitement inactive dans le cas du collodion ordinaire. C'est pourquoi nous avons abandonné les essais avec les sacs en collodion acidifié.

Les expériences de changement de réaction du milieu n'ont pas donné non plus de résultats satisfaisants. La dialyse des

solutions de maltase en milieu acide à HCl 1/200 N pendant quarante-huit heures n'a pas diminué son pouvoir hydrolysant; au contraire, l'addition de cette quantité d'acide a augmenté l'effet de la maltase de 28 p. 100 (1).

Les essais faits pour précipiter les sels de calcium par l'oxalate d'ammonium n'ont pas non plus donné de résultats; le pouvoir hydrolysant de la maltase, ainsi traitée et dialysée ensuite, était analogue à celui de la maltase dialysée simplement.

En mesurant la conductivité électrique de la maltase dialysée, nous avons constaté que la conductivité initiale $K = 81,8 \cdot 10^{-6}$ est devenue $K = 11,9 \cdot 10^{-6}$ après 96 heures de dialyse. Pour enlever les matières qui causent cette conductivité relativement assez élevée, nous avons appliqué le procédé de dialyse de Dhéré, nommé « dialyse électrique ».

Nous nous sommes servi d'un tube en « H », en verre d'Iéna, auquel ont été fixés deux sacs en collodion de 20 millimètres de diamètre et 12 centimètres de longueur, préparés suivant la description ci-dessus. On les remplissait complètement avec la solution de diastase, déjà dialysée pendant 72 heures; on bouchait avec deux bouchons en caoutchouc vaselinés, en ayant soin qu'aucune bulle d'air ne soit emprisonnée. De cette façon, nous avons empêché la filtration à travers le collodion; cette filtration, malgré la dénitrification et la stérilisation, reste toujours assez sensible pour gêner l'opération à la longue. Les deux sacs étaient ensuite plongés dans deux récipients en verre d'Iéna, d'une capacité de 300 cent. cubes, remplis d'eau redistillée de conductivité $K = 0,8$ à $1,1 \cdot 10^{-6}$. Dans ces deux récipients, on plaçait deux électrodes en platine, d'une surface de 4,8 cent. carrés et on établissait une différence de potentiel de 110 volts. L'eau extérieure était changée quatre fois par jour.

Après six heures de dialyse, l'eau dans le récipient positif était nettement alcaline à la phtaléine, dans le récipient négatif franchement acide; aucune de ces deux réactions n'était plus constatée après vingt-quatre heures de dialyse. Pendant la dialyse, la maltase se transportait vers le pôle négatif; le liquide de la branche positive, primitivement opalescent, s'éclaircissait progressivement, et celui de la branche négative se troublait davantage.

La durée de la dialyse était de 48 à 126 heures. Au bout de ce temps, le passage des électrolytes dans l'eau extérieure

(1) Si on compare cette augmentation avec le chiffre obtenu par nous auparavant [9], on voit qu'elle est près de trois fois plus petite que dans le cas de la maltase non dialysée. Probablement alors une partie notable d'acide sert à neutraliser les substances contenues dans la maltase et qui sont éliminées par la dialyse.

était arrêté, ainsi qu'on pouvait le constater au moyen de la conductivité des eaux extérieures (voir tableau IV) :

TABLEAU IV.

N ^{os}	TEMPS de dialyse.	CONDUCTIVITÉ ÉLECTRIQUE DANS LES BRANCHES :		
		Positive.	Négative.	Témoins.
1	1 à 6 heures.	$13,06 \times 10^{-6}$	$9,52 \times 10^{-6}$	$1,85 \times 10^{-6}$
2	24 à 30 heures.	$7,56 \times 10^{-6}$	$5,29 \times 10^{-6}$	
3	48 à 54 heures.	$4,01 \times 10^{-6}$	$4,85 \times 10^{-6}$	
4	72 à 78 heures.	$2,89 \times 10^{-6}$	$3,15 \times 10^{-6}$	$0,8 \text{ à } 1,1 \times 10^{-6}$
5	96 à 102 heures.	$1,63 \times 10^{-6}$	$2,01 \times 10^{-6}$	
6	120 à 126 heures.	$1,28 \times 10^{-6}$	$1,78 \times 10^{-6}$	

Dans un récipient témoin, rempli d'eau de conductivité $K=0,9.10^{-6}$ et abandonné dans les mêmes conditions que les récipients à dialyse, on constatait une conductivité $K=1,7.10^{-6}$ au bout de six heures. Il était donc inutile de prolonger davantage la dialyse électrique.

La solution de la maltase était alors partagée au moyen d'une pipette en trois portions, positive, négative et moyenne, en ayant soin de ne pas mélanger l'une avec l'autre. Les liquides obtenus n'ont pas été filtrés on centrifugés pour les débarrasser de leur trouble.

Les propriétés que possédait la maltase ainsi purifiée sont indiquées dans le tableau V (p. 530).

En prenant le pouvoir hydrolysant moyen et la conductivité moyenne des portions positive, négative et moyenne du liquide dialysé, nous pouvons construire une courbe qui représentera clairement l'influence de la dialyse sur l'action de la maltase (voir la figure, p. 531).

De l'ensemble de ces faits, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

I. — La dialyse ordinaire augmente tout d'abord le pouvoir hydrolysant de la maltase; ce pouvoir passe par un maximum, puis diminue légèrement. Une prolongation de la dialyse n'amène plus alors aucune modification appréciable.

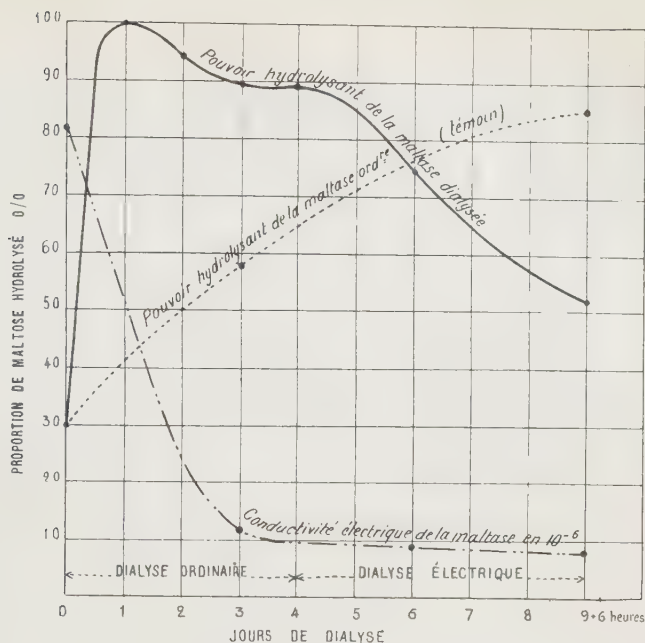
II. — La dialyse électrique, essayée à ce moment, enlève une nouvelle quantité d'électrolytes et abaisse encore un peu le pouvoir diastasique; toutefois il n'a pas été possible, même par ce procédé, d'enlever les dernières traces d'électrolytes.

TABLEAU V.

Maltose. 4 p. 100 (conc. fin.): Maltase. 0.5 p. 100 (conc. fin.); durée d'hydrolyse 3 h. 4/2. — Température + 40°5 centigrades.

N ^{os}	SOLUTIONS de maltase.	MATIÈRES solides à + 110° C. de la maltase.	CENDRES de la maltase.	ACIDITÉ (—) ou ALCALINITÉ (+) à l'élantine, SO_4H^2 en $\frac{100}{100}$ N pour 0,2 gr. de maltase.	CONDUCTIVITÉ des solutions de maltase.	POUVOIR hydrolysant.
1	Maltase filtrée 2 fois sur papier Berzélius. . .	93,42 p. 100	6,42 p. 100	+ 9,8 c. c.	81,3 × 10 ⁻⁶	30,4 p. 100
2	Maltase filtrée 2 fois, abandonnée 72 heures. . .	92,85 p. 100	6,43 p. 100	+ 10,6 c. c.	205,7 × 10 ⁻⁶	61,8 p. 100
3	Maltase filtrée 2 fois, abandonnée 198 heures. . .	93,41 p. 100	6,08 p. 100	+ 11,5 c. c.	205,9 × 10 ⁻⁶	85,7 p. 100
4	Maltase dialysée 72 heures	5,23 p. 100	1,58 p. 100	+ 1,2 c. c.	11,9 × 10 ⁻⁶	89,8 p. 100
5	Maltase dialysée 72 h. et abandonnée 136 h. . .	5,25 p. 100	1,56 p. 100	+ 1,3 c. c.	15,8 × 10 ⁻⁶	97,2 p. 100
6	Maltase purifiée par la dial. électr. 48 heures. (Positive)	—	—	—	—	—
7	Branches (Négative)	0,57 p. 100	Indosable (*).	—	5,2 × 10 ⁻⁶	71,9 p. 100
8	(Moyenne)	3,93 p. 100	0,32 p. 100	—	19,3 × 10 ⁻⁶	100,0 p. 100
		Indosable (*).	Indosable (*).	—	3,8 × 10 ⁻⁶	49,2 p. 100
9	Maltase, purifiée par la dial. électr., 126 heures. (Positive)	—	—	—	—	—
10	Branches (Négative)	3,85 p. 100	Indosable (*).	— 1,0 c. c.	2,6 × 10 ⁻⁶	56,7 p. 100
11	(Moyenne)	—	—	+ 1,2 c. c.	18,5 × 10 ⁻⁶	78,3 p. 100
		—	—	+ 0,5 c. c.	1,4 × 10 ⁻⁶	49,5 p. 100

(*) Dans les 60 cent. cubes du liquide, représentant 0,0615 gramme de substances solides.



III. — La maltase se transporte dans le champ électrique vers le pôle négatif.

IV. — La maltase ainsi purifiée possède une réaction faiblement acide à l'héliantine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRETI. — *Bioch. Zeit.*, vol. IV, 1907, p. 1.
- [2] LÉVY. — *The Journal of Infectious Diseases*, vol. II, 1905, p. 1.
- [3] ZSIGMONDY. — *Zeit. f. Elektrochem.*, vol. IV, 1898, p. 546.
- [4] BECHHOLD. — *Zeit. f. physiol. Chem.*, vol. LX, p. 257.
- [5] BIERRY. — *Soc. Biologie*, vol. I, 1906, p. 1131.
- [6] DHÉRÉ. — *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, vol. CL, 1910, p. 934 et 993.
- [7] G. BERTRAND. — *Bull. de la Soc. de Chim.*, Série 3, vol. XXXV, 1906, p. 1050.
- [8] PORCHER. — *Bull. de la Soc. de Chim.*, Série 3, vol. I, 1905, p. 1285.
- [9] KOPACZEWSKI. — *Zeit. f. physiol. Chem.*, vol. LXXV, 1912, p. 182.

NÉPHRITE ET CIRRHOSE HÉPATIQUE CHEZ LE LAPIN SOU MIS A L'ALIMENTATION LACTÉE (1)

par LOUIS MARTIN et AUGUSTE PETTIT.

(Avec la planche X.)

La reproduction expérimentale de la néphrite et de la cirrhose hépatique n'a guère cessé de préoccuper les pathologistes ; mais les résultats positifs ont été obtenus par des procédés n'ayant, en général, que peu d'analogie avec ceux réalisés naturellement : ingestions et injections massives, sous-cutanées, intrapéritonéales ou intravasculaires de poisons, de toxines, de cytotoxines ; cautérisation du parenchyme ; ligature des voies d'excrétion ou des vaisseaux, etc.

Or, au cours de recherches entreprises à un point de vue différent (2), nous avons constaté que l'alimentation par la poudre de lait du lapin et du rat détermine, en un laps de temps très variable, mais souvent assez court, l'apparition de lésions rénales et hépatiques (3).

Le lapin présente souvent une assez vive répulsion à absorber la poudre de lait, et il n'est pas toujours facile de lui faire accepter d'emblée ce régime. Pour l'y accoutumer, on mélange à du son une quantité progressivement croissante de lait desséché ; au bout d'une huitaine de jours, l'animal s'est ainsi habitué à cette nouvelle nourriture que dès lors il ingère volontiers à l'état de pureté. En dehors du lait, les animaux en

(1) Les résultats préliminaires des présentes recherches ont été communiqués à la Société de Biologie (*Comptes rendus*, t. LXXII, p. 720, 1912).

(2) Nous avons alimenté des lapins exclusivement avec de la poudre de lait pendant plusieurs jours dans le but de leur donner le choléra en leur faisant absorber des bacilles cholériques. Après l'ingestion de ces bacilles, les animaux ont un léger ballonnement du ventre, mais pas de diarrhée ; dans la suite, ils ne présentent aucun symptôme cholérique.

(3) A ce propos, il convient de rappeler que, dès 1884, E. Maurel a signalé l'hypertrophie du foie chez les lapins nourris de fromage (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. XXXVI, p. 646, 1884). Depuis, un certain nombre d'auteurs ont repris l'étude de l'influence des régimes azotés sur les rongeurs, en particulier M. Garnier. (Voir, à ce sujet, 1^{er} Congrès international de pathologie comparée : I. *Rapports*, p. 516-517, 1912.)

expérience n'ont à leur disposition que de l'eau de conduite renfermée dans un verre conique servant communément à donner à boire aux oiseaux.

Pour le rat, la mise au régime lacté est des plus simples ; ce rongeur absorbe volontiers la poudre de lait ; on peut donc substituer sans transition cette substance aux aliments usuels.

Lapins et rats ont le lait et l'eau à discrétion, mais il est impossible d'indiquer les quantités consommées, car ces animaux rejettent toujours une proportion notable d'eau et de poudre en dehors des récipients.

La présente note est consacrée, à l'exclusion des autres troubles organiques, à l'étude des altérations rénales et hépatiques qui peuvent apparaître chez le lapin et chez le rat consécutivement au régime lacté intégral.

Dans des recherches de ce genre, le choix des animaux exige une grande attention, en raison des affections qui ont pu se développer spontanément. Pour éliminer cette cause d'erreur, nous avons procédé de la façon suivante : nous ne retenons, comme sujets d'expérience, que les lapins dont l'état général est parfait. Ce premier triage effectué, nous éliminons par l'examen des crottes les spécimens atteints de coccidiose et, grâce à l'examen urologique, nous nous assurons de l'intégrité du rein. En outre, chez un certain nombre d'animaux, nous avons pratiqué une biopsie du foie une huitaine de jours avant la mise au régime lacté.

Le prélèvement d'un fragment de tissu hépatique s'effectue avec une grande facilité ; il suffit de faire une incision médio-ventrale au-dessous de l'appendice xiphoïde et de réséquer avec des ciseaux un fragment de parenchyme ; l'hémostase s'obtient sans suture, car le sang cesse rapidement de s'écouler, surtout si on touche la plaie avec un tampon imbibé d'une solution de gélatine et de chlorure de calcium.

L'animal ne souffre guère de cette intervention et il ne tarde pas à se remettre complètement. Au bout de quelques semaines, la réparation de la perte de substance est parfaite ; néanmoins, lors de la nécropsie, les prélèvements de pièces sont effectués loin du bord où a été pratiquée la biopsie.

Pour les rats, nous avons dû nous contenter de l'examen des urines.

Nos expériences ont porté sur 46 lapins et sur 9 rats ; pour éviter des redites, nous nous bornerons à reproduire ici les protocoles de quatre expériences seulement, choisies parmi les plus typiques.

Obs. I. — Lapin pesant 2.310 grammes, 1^{er} février. Ni coccidiose, ni albuminurie, ni cylindrurie, ni glycosurie ; biopsie du foie.

Mis au régime du lait le 13 février 1912 ; 26 février, poids, 2.240 grammes ; 4 mars, poids, 2.230 grammes ; 11 mars, poids, 2.210 grammes ; 18 mars, poids, 2.150 grammes ; 26 mars, poids, 2.440 grammes, légère glycosurie ; 1^{er} avril, poids, 2.520 grammes ; 9 avril, poids, 2.430 grammes ; 15 avril, poids, 2.550 grammes, légère albuminurie, légère glycosurie ; 6 mai, poids, 2.550 grammes, ni glycosurie, ni albuminurie ; 13 mai, poids, 2.650 grammes, poids d'urée par litre de sang : 1,66 gramme ; 20 mai, poids, 2.700 grammes ; 27 mai, poids, 2.440 grammes ; 3 juin, poids, 2.510 grammes ; 10 juin, poids, 2.620 grammes ; 17 juin, poids, 2.700 grammes ; 24 juin, poids, 2.570 grammes ; 1^{er} juillet, poids, 2.400 grammes. L'animal est alors sacrifié. Poids d'urée au litre de sang : 0,39 gramme ; poids d'urée au litre d'urine : 20 grammes.

Rein : la capsule est légèrement épaissie et elle envoie, par places, des septa qui pénètrent dans la substance corticale et qui sclérosent de petits territoires ; à ce niveau, les tubes peuvent être détruits et remplacés par du tissu fibreux. Des phénomènes de sclérose encore discrète s'observent assez avant dans la substance corticale : les tubes sont encerclés dans du tissu fibreux et la capsule de Bowmann s'épaissit en même temps que les noyaux prolifèrent. Les tubes droits renferment des débris cellulaires.

Foie : sclérose à début portal, bien dessinée ; sclérose centrale beaucoup moins accusée. La plupart des lobules sont complètement isolés par des faisceaux de fibres conjonctives pures ou entremêlés de cellules embryonnaires. De ces réseaux émanent des fibres qui s'insinuent entre les cordons de Remak et sclérosent les cellules, qui disparaissent ainsi progressivement (fig. 7). Dans l'épaisseur du lobule, là où il n'existe pas de sclérose, les cellules hépatiques offrent un certain degré de dégénérescence graisseuse et plus rarement de la nécrose de coagulation. Enfin les capillaires renferment une proportion anormale de cellules : leucocytes, cellules de Kupffer remplies de débris cellulaires, etc...

Obs. II. — Lapin pesant 3.100 grammes, 25 mars. Ni coccidiose, ni albuminurie, ni cylindrurie, ni glycosurie ; biopsie du foie.

Mis au régime du lait le 2 avril 1912 ; 9 avril, poids, 3.100 grammes ; 15 avril, poids, 3.100 grammes ; 6 mai, poids, 2.880 grammes ; 20 mai, poids, 3.000 grammes ; 27 mai, poids, 2.970 grammes ; 3 juin, poids, 2.960 grammes ; 10 juin, poids, 3.080 grammes ; 17 juin, poids, 3.060 grammes ; 1^{er} juillet, poids, 2.830 grammes ; 8 juillet, poids, 2.880 grammes ; 10 juillet, légère albuminurie ; 12 juillet, le sang renferme 0,345 gramme d'urée par litre ; 15 juillet, poids, 2.400 grammes ; 22 juillet, poids, 2.520 grammes ; 29 juillet, poids, 2.480 grammes ; 31 juillet, ni glycosurie, ni albuminurie ; 5 août, poids, 2.390 grammes ; 12 août, poids, 2.430 grammes ; 19 août, poids, 2.435 grammes ;

20 août, l'urine renferme 0,25 gramme d'albumine par litre ; le sang, 0,55 gramme d'urée par litre ; 27 août, albuminurie et glycosurie ; poids, 2.400 grammes ; 3 septembre, poids, 2.460 grammes ; 10 septembre, poids, 2.530 grammes ; 17 septembre, poids, 2.590 grammes ; 24 septembre, poids, 2.510 grammes ; 30 septembre, très forte albuminurie ; l'animal meurt.

Rein. — La plupart des tubes du segment à bordure en brosse ont leur lumière partiellement obstruée ; on y observe soit un magma granuleux, soit des cellules à noyaux pycnotiques, soit encore des cylindres réfringents ; quelques tubes sont complètement dépourvus d'épithélium.

Les tubes droits sont profondément altérés ; ils sont remplis soit par un magma parsemé de noyaux, soit par des hématies.

La vitrée est, d'une façon générale, sensiblement épaissie ; d'autre part, on observe de petits foyers épars de sclérose intertubulaire.

Foie. — Dans les diverses zones examinées, il existe une sclérose périportale bien dessinée (fig. 8) enserrant presque complètement les lobules ; la veine centrale est également le point de départ d'un processus de sclérose, mais celui-ci est moins intense que le précédent. Le tissu conjonctif est formé de fibres denses qui, à la périphérie, s'insinuent entre les cellules hépatiques altérées.

On notera, d'autre part, une hyperplasie accentuée des canalicules biliaires au sein des éléments conjonctifs interlobulaires.

Quant aux cellules hépatiques, elles sont en général le siège d'une nécrose de coagulation assez accusée.

Ces deux observations donnent une idée de la façon dont les lapins résistent au régime lacté exclusif, mais il est nécessaire de synthétiser les résultats fournis par les autres sujets mis en expérience.

Un premier fait est à noter : les seize lapins mis au régime lacté sont morts, mais, alors que tous les animaux ont été traités exactement de la même façon et souvent même dans des cages communes, la survie a varié dans de larges limites ; elle a été de 36, 44, 48, 56, 57, 63, 64, 65 (2 sujets), 68, 69, 89, 107, 112, 139 (sacrifié malade) et 181 jours.

La façon dont les animaux se comportent sous l'influence du régime lacté, n'est pas moins variable ; le tiers environ des lapins commence par engraisser (de 400-500 grammes) ; le restant, au contraire, ne cesse de maigrir dès le début ; mais, parmi ces derniers, quelques-uns peuvent présenter un accroissement de poids passager.

Il est à remarquer, d'ailleurs, que l'engraissement initial n'a pas de signification pour le pronostic ; ainsi, tel animal dont le poids est de 2.250 grammes au début et qui ne cesse d'augmenter de poids jusqu'au moment de sa mort (2.800 grammes) ne survit que pendant trente-six jours, alors que le lapin de l'obser-

vation II, qui n'a guère cessé de maigrir, résiste au régime cent quatre-vingt-un jours.

Enfin, il est à noter que nombreux sont les cas où le poids somatique, au moment de la mort, excède de plusieurs centaines de grammes le poids initial (400-500 grammes environ), ce qui prouve que la mort n'est pas due à l'inanition (1).

Au point de vue anatomo-pathologique, le rein et le foie présentent également des variations individuelles très étendues.

Rein. — Relativement à la glande rénale, deux faits sont constants : à un certain moment, au moins, le lapin est albuminurique et, au moment de la mort, il présente des signes manifestes de néphrite. Mais, en dehors de ces deux symptômes, le tableau anatomo-pathologique est assez variable ; l'apparition de l'albuminurie, notamment, peut s'échelonner sur un laps de plusieurs semaines et parfois même ne faire son apparition que peu de temps avant la mort ; son taux varie également de quelques décigrammes à plusieurs grammes par litre (4 grammes au maximum) ; enfin, elle peut offrir des rémissions assez longues, mais elle réapparaît aux approches de la mort.

En outre de l'albuminurie, certains animaux présentent de l'indicanurie, de la glycosurie, de la cylindrurie (cylindres granuleux et cylindres cellulaires, cellules rénales isolées) et de l'hématurie.

Le début de la néphrite est marqué par de la nécrose de coagulation du cytoplasma du segment à bordure en brosse ; bientôt après, des fragments du syncytium parsemés de noyaux pyknotiques se détachent de la vitrée et tombent dans la lumière ; on peut ainsi observer, au niveau de divers segments, des tubes dont l'épithélium est abrasé (2).

Consécutivement à ces modifications, la lumière du tube urinaire s'obstrue plus ou moins complètement de cylindres épithéliaux ou de cylindres granuleux à divers stades de concrétion, depuis le segment à bordure en brosse jusqu'au sommet de la papille (fig. 4).

(1) Remarquons, à ce propos, qu'aucun de nos animaux n'a présenté d'œdème.

(2) Il ne s'agit point ici d'un phénomène cadavérique ; ce processus est parfaitement net sur les pièces recueillies chez l'animal à l'agonie.

Une autre cause d'oblitération est représentée par les hémorragies qui peuvent remplir complètement d'hématies les canalicules dans la portion comprise entre le segment à bordure en brosse et l'extrémité terminale des tubes droits (fig. 2).

Chez nombre de lapins, les lésions ne dépassent pas ce stade ; mais, chez certains sujets dont la survie est assez prolongée, on observe l'apparition de tissu embryonnaire dans les espaces intertubulaires, soit dans le voisinage des vaisseaux, soit en continuité avec la capsule (fig. 5). Dans ce dernier cas, qui est fréquent, des lames de tissu fibreux, irradiant de la capsule en général épaissie, s'organisent sur le trajet des éléments embryonnaires et sclérosent les glomérules et les tubes dont l'épithélium est altéré ; on assiste ainsi (fig. 6) à la substitution de tissu scléreux au tissu glandulaire normal ; en d'autres termes, la néphrite épithéliale se transforme en néphrite interstitielle.

Foie. — Les lésions hépatiques sont assez uniformes. Lorsque la survie n'est pas prolongée, celles-ci se résument en de la dégénérescence graisseuse, de la nécrose de coagulation et de congestion vasculaire (surtout nette au centre du lobule), dont le degré peut varier dans d'assez larges limites. En tout cas, la sclérose n'est bien marquée que chez les lapins ayant survécu plus de deux mois, et l'exemple de cirrhose le plus typique que nous ayons observé nous a été fourni par le lapin qui a survécu cent quatre-vingt-un jours.

En somme, en sériant chronologiquement les animaux, on peut schématiser l'évolution des lésions de la façon suivante : pendant un laps de temps relativement assez prolongé, les altérations se bornent à des troubles circulatoires et à des lésions cellulaires ; plus tard, lorsque celles-ci atteignent un certain degré, le tissu conjonctif interlobulaire entre en prolifération et il en émane des fibrilles qui entourent les cellules limitrophes préalablement altérées, les sclérosent et se substituent à elles (fig. 7) ; finalement, lorsque la survie est prolongée, le processus sclérosant aboutit à une cirrhose surtout évidente au niveau de l'espace porte ; la sclérose centrale se manifeste plus tardivement encore et elle n'atteint pas l'intensité de la périportale (fig. 8).

Nous noterons, en outre, que chez un petit nombre de sujets,

les canaux biliaires interlobulaires s'hyperplasient et on voit ainsi s'esquisser une cirrhose avec hyperplasie biliaire.

D'une façon générale, l'évolution des lésions rénales et hépatiques, que nous venons de signaler, s'accompagne d'une augmentation de la teneur du sang en urée ; de 0,3-0,4 grammes par litre, le taux s'élève progressivement sans que, dans certains cas, on puisse encore déceler d'albuminurie ou de glycosurie (1) ; mais, dès que l'azotémie a atteint une élévation notable, l'albuminurie (et la cylindrurie dans nombre de cas) fait son apparition ; dès lors, les troubles organiques s'aggravent et, aux approches de la mort, le sang renferme en moyenne 2 grammes d'urée par litre (avec un maximum de 4,75 grammes et un minimum de 0,6 gramme) (2).

Envisageons maintenant la façon dont se comportent les rats blancs soumis au régime lacté. A cet effet, nous reproduirons tout d'abord les protocoles de deux expériences.

Obs. III. — Rat blanc pesant 140 grammes. Urine normale. Mis au régime du lait le 16 février 1912 ; 4 mars, poids 140 grammes ; 11 mars, poids 150 grammes ; 18 mars, poids 145 grammes ; 25 mars, poids 100 grammes ; 29 mars, poids 98 grammes. Sacrifié moribond. Albuminurie.

Rein : nécrose de coagulation étendue à un très grand nombre de tubes du segment à bordure en brosse ; certains, parmi ceux-ci, sont réduits à un magma granuleux remplissant complètement la lumière ; ailleurs, noyaux et fragments de cytoplasma dans la lumière ; dans les tubes excréteurs, des cylindres très denses et quelques hématies ; enfin il existe une sclérose au début.

Foie : un certain nombre de cellules présentent de la nécrose de coagulation.

Obs. IV. — Rat blanc pesant 100 grammes. Urine normale. Mis au régime du lait le 16 février 1912 ; 4 mars, poids 100 grammes ; 11 mars, poids 95 grammes ; 18 mars, poids 95 grammes ; 25 mars, poids 98 grammes ; 1^{er} avril, poids 85 grammes ; 9 avril, poids 95 grammes ; 15 avril, poids 95 grammes ; 13 mai, poids 125 grammes, 20 mai, poids 125 grammes ; 27 mai, poids 105 grammes ; 16 juin, poids 78 grammes ; sacrifié moribond. Albuminurie.

Rein : un certain nombre de tubes présentent de la nécrose de coagulation ; à l'intérieur de quelques-uns, des débris cellulaires ; cylindres colloïdes dans les tubes droits ; certaines capsules de Bowmann renferment

(1) Certains lapins venant directement du marché présentaient des taux plus élevés (0,6 gramme et plus), mais ces animaux étaient plus ou moins gravement atteints ainsi que le montra la nécropsie.

(2) Les déterminations ont été faites par la méthode de R. Moog.

un exsudat ; enfin, quelques régions peu étendues offrent des phénomènes de sclérose.

Foie : nécrose de coagulation légère et commencement de réaction conjonctive.

Nos expériences ont porté sur neuf rats et, pour six d'entre eux, les résultats concordent d'une façon générale avec ceux des deux observations précédentes ; les sujets meurent au bout de quelques semaines ou de plusieurs mois et, à l'autopsie, le rein présente des phénomènes de nécrose au niveau du segment à bordure en brosse ainsi que des cylindres (fig. 3) ; dans certains cas, on observe, en outre, un léger degré de sclérose (fig. 3 et 4) ; au niveau du foie, on note des dégénérescences cellulaires et, plus rarement, une légère prolifération conjonctive. Mais, certains rats présentent une survie considérable : deux rats ont résisté huit mois sans autre trouble apparent qu'un retard dans l'accroissement somatique ; à ce moment, l'albuminurie a fait son apparition et la mort est survenue au neuvième mois ; le dernier rat était encore vivant, après avoir présenté passagèrement de l'albuminurie, au bout de dix mois.

En somme, les rats s'accommodent beaucoup mieux que les lapins du régime lacté exclusif ; néanmoins, dans nombre de cas, cette alimentation peut entraîner, entre autres troubles, l'apparition de lésions rénales et hépatiques.

En résumé, un trouble dans l'alimentation est suffisant pour provoquer de la cirrhose hépatique et de la néphrite avec azotémie ; mais, dans la genèse et l'évolution de ces altérations organiques, les conditions individuelles jouent un rôle important.

Il est à noter que les altérations morphologiques du rein apparaissent antérieurement aux lésions hépatiques ou, tout au moins, qu'elles affectent une gravité plus grande. Cette constatation peut être invoquée en faveur de l'opinion suivant laquelle des connexions étroites réuniraient l'un à l'autre le foie et le rein ; si on adoptait cette hypothèse, les lésions hépatiques apparaîtraient comme un exemple de foie rénal.

En dehors de leur intérêt propre, ces recherches ont l'avantage de mettre à la disposition des pathologistes et des chimistes un procédé simple permettant d'étudier expérimentalement divers problèmes relatifs aux maladies du rein et du foie.

EXPLICATION DE LA PLANCHE X

1. LAPIN. — Rein. Papille. Tubes excréteurs avec cylindres épithéliaux.
Survie : quarante-quatre jours.
2. LAPIN. — Rein. Papille. Tubes excréteurs remplis d'hématies.
Survie : quarante-huit jours.
3. RAT. — Rein. Substance corticale. Tubes avec cylindres et sclérose intertubulaire.
Survie : cinquante et un jours.
4. RAT. — Rein. Substance corticale. Tubes dont l'épithélium est nécrosé.
Début de sclérose intertubulaire.
Survie : soixante-dix-sept jours.
5. LAPIN. — Rein. Substance corticale. De la capsule émanent des bandes *b*, de tissu fibreux riche en cellules embryonnaires qui pénètrent la substance corticale.
Survie : soixante-huit jours.
6. LAPIN. — Rein. Substance corticale avec sclérose affectant surtout l'aspect de bandes rayonnantes, *b*.
Survie : quatre vingt-neuf jours.
7. LAPIN. — Foie. Tissu de sclérose en voie de se substituer aux cellules hépatiques.
Survie : cent trente-neuf jours.
8. LAPIN. — Foie. Cirrhose biveineuse.
Survie : cent quatre-vingt-un jours.

LES ANAÉROBIES DANS LA FIÈVRE TYPHOÏDE

par J. LORIS-MELIKOV.

(Travail du laboratoire de M. le professeur Metchnikoff.)

La fièvre typhoïde présente, au point de vue clinique, des formes très différentes. Tantôt ce sont les troubles nerveux qui sont au premier plan, tantôt, au contraire, ce sont les troubles intestinaux : hémorragies, perforations intestinales, etc. On voit tantôt des formes nerveuses, adynamiques, ataxiques, où le malade ne présente rien de spécial au point de vue intestinal, tantôt des formes ambulatoires où ces mêmes troubles digestifs semblent prédominants : tantôt, enfin, les deux ordres de symptômes marchent de pair.

Il était intéressant d'étudier la flore bactérienne accompagnant le bacille d'Eberth et de voir si, parmi les microbes qui la composent, il en est qui sont susceptibles de jouer un rôle important et d'imprimer à la maladie une allure clinique spéciale. La tuméfaction et l'action nécrosante produite sur les follicules lymphatiques sont-ils le fait du seul bacille d'Eberth ou d'une association de ce bacille avec une autre bactérie, ou même d'une autre espèce analogue à ces anaérobies protéolytiques à pouvoir nécrosant, comme le *B. perfringens*, vibrion septique, *B. sporogenes*, etc.? Tel est le problème que, sur le conseil et sous la direction de mon maître, le professeur Metchnikoff, j'ai essayé de résoudre.

La tâche m'était singulièrement facilitée par tous les travaux antérieurs sur la flore microbienne de l'intestin provenant de l'école de l'Institut Pasteur. Je n'ai eu qu'à me louer des conseils et de l'aide apportés par mes camarades et en particulier de M. Tissier, que je tiens à remercier ici.

En examinant au microscope des selles de typhiques, on y voit une grande variété de bactéries. On constate d'abord une pullulation des formes cocciennes et coccobacillaires des types *B. coli* et entérocoques, phénomène qui se voit

dans toutes les diarrhées (1). On voit, en outre, de fins bacilles grêles décolorés par la méthode de Gram et formant avec les cocci et les coccobacilles la majorité des espèces, puis des bactéries colorées par cette même méthode, bacilles moyens, rigides, analogues aux formes de *B. acidophilus* et *B. exilis*, puis des bacilles plus gros, plus larges, tantôt longs et infléchis, tantôt courts et trapus. Je me suis borné, pour le moment, à l'étude des bactéries anaérobies à spores. Comme technique, j'ai employé d'abord les méthodes ordinaires. J'ai fait mesensemencements dans des tubes de gélose sucrée, fondue à 100 degrés et maintenue quelques secondes après dans l'eau bouillante. Cette manière de faire ne pouvait me donner que les microbes sporulés au moment de l'ensemencement, mais non pas ceux qui, pour une raison ou pour une autre, n'auraient présenté que des formes végétatives. Me basant sur mes recherches sur la sporulation du *B. perfringens* (2), j'ai ensemencé directement, dans des tubes de bouillon ordinaire au blanc d'œuf, ce qui m'a donné un plus grand nombre de colonies en gélose glucosée.

Enfin, pour me rapprocher le plus possible du milieu intestinal, j'ai ajouté au bouillon de la bile en parties égales. Ce liquide n'est-il pas, en outre, un milieu d'élection pour le bacille d'Eberth? Ne pouvait-on pas supposer qu'il serait aussi un excellent milieu pour ses commensaux?

Le résultat obtenu n'a fait que me confirmer dans cette idée.

J'ai pu isoler par ces diverses méthodes le *B. perfringens* de Welch, une variété très particulière de ce même *B. perfringens*, plus active, plus pathogène, le *B. III* de Rodella et une bactérie qui ne me semble pas avoir été décrite jusqu'ici et que j'appellerai *Bacille anaérobie satellite*.

Je n'ai jamais rencontré, quels que soient les soins apportés auxensemencements, le *B. putrificus* de Bienstock et le *B. bifementans* de Tissier, dans les selles des malades atteints du typhoïde confirmée, 100 cas environ (3).

(1) TISSIER, *Flore intestinale des nourrissons*, 1900.

(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 18 décembre 1909, t. LXVII, p. 806.

(3) Je profite de l'occasion pour exprimer ma reconnaissance aux chefs de services des hôpitaux qui m'ont permis de profiter des matériels typhiques : professeur Chantemesse, Widal, Letulle, Sacquépée, Martin, Rieux, Lesage et autres.

Je n'ai rencontré que rarement le *B. sporogenes* de Metchnikoff. Fait assez curieux, je n'ai obtenu cette bactérie que durant les mois d'avril, mai et juin.

DESCRIPTION DES MICROORGANISMES

B. Perfringens de Welch. — Il n'y avait rien d'étonnant de rencontrer cette bactérie dans les selles des typhiques, puisqu'elle fait partie de la flore intestinale de l'adulte.

Rappelons cependant que, d'après Tissier, elle n'y est représentée que par de rares échantillons par rapport aux autres bactéries. Dans les cas qui nous occupent, on en trouvait toujours de nombreux échantillons, et ceci malgré la *modification diarrhéique* qui tend toujours à l'élimination des anaérobies.

Les échantillons que j'ai pu étudier ne présentaient rien de spécial. Leur description est identique aux descriptions classiques. Ils ne donnaient que de faibles traces d'indol, mais nettement des phénols au cours de leur attaque des matières protéiques. Ils attaquaient tous les sucres, glucose, lactose, saccharose, etc., en donnant une acidité d'arrêt oscillant entre 2,94 et 3,43 (évaluée par 1.000 en SO^+H^2). Ils donnaient, au cours de cette attaque, comme acide volatil, évalué d'après la méthode de Duclaux, principalement de l'acide formique.

L'étude de leur virulence m'a donné des résultats plus intéressants. Dans tous les cas graves avec complications intestinales : hémorragie, perforations, etc., les bacilles isolés tuaient le cobaye en douze à dix-huit heures par injection intrapéritonéale de 1 cent. cube d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures.

Dans les cas bénins et chez les convalescents, les variétés isolées se sont, la plupart du temps, montrées inoffensives.

Dans 30 observations, 16 fois l'injection intrapéritonéale tuait le cobaye de 250-300 grammes en moins de 16 heures.

Variété de B. perfringens (Variété acétique). — Il faut mettre à côté de cette description celle d'une variété de *B. perfringens* qui m'a paru mériter une mention spéciale.

Au microscope, ce microorganisme se présente sous l'aspect de bâtonnet à peu près de même grosseur que le *B. perfringens* banal, mais presque toujours terminé en massue. Dans

les cultures un peu anciennes, il se présente sous la forme de longs filaments incurvés ou plissés. Sa vitalité est bien supérieure à celle du *B. perfringens* ordinaire. J'ai pu le réensemencer de culture en gélose de trois à quatre mois. Les spores sont grosses, de forme ovale, semblables à celles que j'ai décrites pour le *B. perfringens*. Son action sur les sucres ne présente rien à signaler. L'acidité d'arrêt égale 2,94 à 3,43 p. 1000 en SO^4H^2 .

Au moyen de la méthode de Duclaux, on peut se rendre compte qu'en bouillon glucosé il donne, comme acide volatil, de l'acide acétique. Son action sur les matières albuminoïdes semble plus grande. Dans le lait, par exemple, la caséine précipitée est creusée de larges vacuoles et disparaît presque en entier. La gélatine ordinaire est rapidement liquéfiée. La gélatine sucrée reste solide. Au cours de cette attaque des protéiques, il donne beaucoup plus de phénols et d'indol que le *B. perfringens* ordinaire. Sa virulence est aussi plus grande. Les injections dans le péritoine amènent la mort de l'animal en seize heures. On note à l'autopsie une hyperhémie intense des organes abdominaux. Le foie et la rate sont recouverts de fausses membranes. Les intestins sont rouges et baignent dans un liquide séro-sanguinolent. La muqueuse est recouverte de fausses membranes. Les plaques de Peyer sont tuméfiées, rouges, mais jamais ulcérées. En général, les auteurs qui ont isolé le *B. perfringens* dans les cas pathologiques l'ont trouvé virulent, Veillon et Zuber dans les appendicites, Grégorof dans les cas semblables; de même, Tissier a trouvé que l'échantillon isolé d'une diarrhée spéciale possédait une activité fermentative et une virulence très grandes.

Au contraire, dans les matières fécales d'individus normaux, tous les auteurs ont constaté que ces diverses actions sont extrêmement atténuées.

S'agit-il d'une bactérie dont la virulence s'est accrue du fait du processus pathologique, ou s'agit-il de races spéciales capables de jouer un rôle dans ce même processus? Nous serions tenté d'adopter cette dernière hypothèse, puisque nous avons trouvé côte à côte la variété banale et la variété pathogène.

B. de Rodella. — Je mentionnerai également la présence d'une autre bactérie à spores dans les selles des typhiques (*B. III Rodella*). C'est également un hôte habituel de l'intestin chez l'enfant et chez l'adulte. Ce serait, pour Tissier, une bactérie de peu d'importance, ferment faible des sucres et des protéoses. Son acidité d'arrêt serait d'environ 1,47 et il ne donnerait ni indol ni phénol au cours de son attaque des matières protéiques. Je dois ajouter que je ne l'ai jamais isolé dans les périodes des premiers septénaires, mais dans la période terminale et la convalescence. Il semble revenir avec les autres bactéries anaérobies normales. Les échantillons que j'ai pu obtenir avaient les caractères décrits par Rodella au point de vue morphologique et, au point de vue chimique, par Tissier. J'ai cependant pu voir que cette bactérie donne comme acide volatil un mélange d'acide formique et acétique, ce que n'a pas signalé ce dernier auteur.

B. sporogenes. — Longtemps, dans nos recherches, nous ne parvenions pas à rencontrer *B. sporogenes* de Metchnikoff, quand, enfin, au mois d'avril, j'ai pu constater sa présence dans les cultures des selles typhiques. Les échantillons des mois de septembre-octobre en étaient dépourvus. Le même fait s'est reproduit l'année suivante. Au point de vue morphologique, chimique et de la virulence, nous avons constaté l'identité avec le *B. sporogenes* décrit par Metchnikoff.

B. satellites. — Tant que je me suis servi, pour mes isoléments, des méthodes ordinaires, je n'ai pu isoler des bactéries autres que *B. perfringens*. Je trouvais, il est vrai, dans les tubes de gélose ensemencés à 100 degrés ou dans les bouillons blanc d'œuf, des formes un peu différentes, plus longues, effilées, mais les colonies de *B. perfringens* fragmentant les milieux par une abondante production de gaz, empêchaient tout isolement.

Au contraire, après passage en milieu blanc d'œuf mélangé de bile, j'ai pu obtenir, dans ces tubes, d'abondantes colonies de ce *B. satellitis* et moins de colonies du *B. perfringens*, soit que la bile ait favorisé le développement du premier ou gêner la germination du second. En dernier lieu, je ne me suis servi

que de bile et de bouillon en parties égales, puisque le blanc d'œuf est favorable à la germination du *B. sporogenes*. Les résultats m'ont semblé meilleurs encore. Ce bacille se présente sous la forme d'un bâtonnet de moyenne grosseur (moins gros que *B. perfringens*) à bout arrondi, court et rigide dans les cultures jeunes, mais très rarement en chaînette.

Il est incurvé, replié à angle droit ou obtus, ou en sens inverse, en S, dans les cultures plus âgées. Dans les vieilles cultures, il se présente sous la forme de longs filaments plissés ou incurvés, à extrémités effilées et partie médiane renflée.

Il se colore par les méthodes ordinaires et par la méthode de Gram. Il perd rapidement cette dernière propriété; dans des cultures un peu anciennes, la plupart des individus se décolorent.

Il est immobile. Toutes les recherches pour colorer les cils sont restées sans résultat. Il donne des spores ovoïdes, très allongées, ce qui lui donne parfois l'aspect de courts bâtonnets. Ces spores résistent deux à trois minutes à la température de 100 degrés. C'est un anaérobie strict ne poussant qu'à 37 degrés. En gélose sucrée profonde il donne, au bout de seize à vingt-quatre heures, au-dessous de la zone aérée, des fines colonies transparentes à bords nets. Quand elles sont assez éloignées des autres, elles se développent mieux et présentent, au bout de quelques jours, la forme de lentilles à bord transparents, découpés et à centre opaque.

On peut enfin, dans des cultures provenant de repiquages, voir ces colonies présenter des bords déchiquetés et émettre des fins prolongements élégants, assez courts, surtout quand elles se développent dans le voisinage de la zone aérée.

Il pousse mal dans les milieux ordinaires, surtout quand ils ne sont pas fraîchement préparés, plus mal encore dans les milieux liquides.

Le milieu gélosé est disloqué par les gaz, mais moins que par *B. perfringens* et dégage une odeur putride très caractéristique.

Ce bacille pousse aussi en gélatine à 37 degrés, que le milieu soit sucré ou non. En refroidissant, la gélatine ne se solidifie plus, elle est peptonisée.

Dans les milieux liquides, bouillon ordinaire, glucosé, lactosé,

saccharosé, etc., il se produit un léger trouble. Au bout de quelques jours, le liquide s'éclaircit et il se forme au fond du vase un dépôt granuleux. Il pousse également dans la bile pure, mieux encore quand ce liquide est coupé de moitié de bouillon ordinaire.

Quand ces bouillons contiennent des cubes de blanc d'œuf, il ne semble pas se produire d'attaque de l'albumine, mais quand on ajoute à ce même milieu de la bile, le blanc d'œuf disparaît au bout d'un mois environ.

Tous ces liquides dégagent une forte odeur caractéristique, putride, sulfureuse et présentent une réaction neutre.

Le lait est transformé lentement en liquide roussâtre. La caséine disparaît presque en totalité au bout d'un à deux mois. Les propriétés chimiques de ce microbe sont celles d'un ferment des matières protéiques.

Il ne semble pas faire fermenter beaucoup le glucose, car l'acidité des milieux ne dépasse guère 0,98, évaluée en SO_2H^2 p. 1000, mais il le brûle, car le dosage du sucre restant montre que la moitié environ a disparu. Les acides volatils produits au cours de cette légère attaque sont des acides butyrique et acétique. Le mélange serait, d'après les tables de Duclaux, de 4 d'acide butyrique pour 5 d'acide acétique.

Il ne fait pas fermenter le lactose ni le saccharose. Il attaque toutes les matières albuminoïdes en donnant, entre autres produits de désintégration, de l'ammoniaque, de l' H^2S , beaucoup d'indol et de phénol.

Cette description du *B. satellitis*, morphologique, biologique et chimique, montre qu'il a certains caractères qui le rapprochent du *B. perfringens* et d'autres qui sont communs avec le *B. sporogenes* et le vibrion septique, mais il se différencie nettement de l'un et de l'autre et semble mériter une place tout à fait à part. Sa virulence est extrêmement variable. Tantôt on rencontre des échantillons très pathogènes et très virulents, tantôt des formes peu actives. Cette variation de la virulence rappelle celle du bacille d'Eberth. Injecté dans le péritoine à la dose d'un centigramme, sa culture en bouillon tue le cobaye de 250 à 350 grammes en seize heures au plus. Cette virulence baisse assez rapidement dans les cultures un peu vieilles. Pour la faire reparaître, ou pour l'augmenter, il

suffit d'augmenter la dose jusqu'à 5 centigrammes, ou de la mélanger avec la culture du bacille d'Eberth.

Après deux ou trois passages par le cobaye, le *B. satellite*, récupère sa virulence première et la dose mortelle descend jusqu'à 1 ou 1/2 cent. cube de la culture du bouillon de vingt-quatre heures.

On trouve à l'autopsie de l'animal la séreuse baignée d'un liquide séro-sanguinolent. La paroi de l'intestin est épaissie et ramollie. Les plis sont effacés. La muqueuse est recouverte d'une couche séro-fibrineuse blanchâtre.

Les plaques de Peyer sont tuméfiées et ulcérées. Les ganglions mésentériques, surtout de l'appendice iléo-cæcal sont bien visiblement tuméfiés. Le péricarde et la plèvre sont baignés du liquide séro-sanguinolent et les poumons sont congestionnés à la base.

Quand on examine au microscope une coupe d'une de ces plaques ulcérées, on voit les espaces lymphatiques gonflés et bourrés de lymphocytes avec, par endroits, amas de bactéries. La muqueuse qui recouvre le follicule a disparu, le tissu lymphoïde est nécrosé par place, mais l'ulcération n'atteint jamais les couches musculaires.

Quand la mort de l'animal s'est produite, plus tardivement vers le troisième ou quatrième jour, cette action sur le tissu lymphatique est plus notable encore.

Les animaux qui prennent des cultures de ce bacille, mélangées à leurs éléments, maigrissent et meurent en un temps plus ou moins long : dans un cas au bout de huit jours, dans un autre au bout de vingt jours. Dans ces deux cas, la muqueuse présentait des lésions rappelant celles que nous venons de décrire, la tuméfaction des ganglions mésentériques, le gonflement et l'ulcération de plaques de Peyer.

Le sérum des typhiques agit sur ce microbe et l'agglutine. Les amas produits n'ont jamais l'aspect des amas de bacilles d'Eberth. Nous en avons rencontré dans des dilutions à 1 p. 100.

Enfin, il est un fait sur lequel il faut attirer l'attention : je n'ai trouvé ce bacille que dans les cas de typhoïde confirmée.

Dans un cas qui, très probablement, est attribuable à une contagion de laboratoire, je n'ai pas trouvé de traces de *B. satel-*

litis; dans trois cas de fièvre typhoïde chez des enfants, je n'ai pu trouver ce microbe.

Dans près de cinquante cas chez des individus normaux ou chez des malades atteints d'affections diverses ou même d'infections intestinales, ou chez des porteurs des bacilles d'Eberth, je n'ai jamais pu les retrouver dans mes cultures.

On en rencontre même plus souvent que le bacille d'Eberth dans les cas des typhoïdes. Ainsi dans sept cas de fièvre typhoïde, en faisant ensementer dans la bile 24 heures et ensuite dans le milieu Conradi-Drigalsky, on n'a pu isoler, l'été dernier, qu'une fois sur sept le bacille d'Eberth, et, dans ces mêmes cas, j'ai isolé six fois le *B. satellitis*.

Dans les cas de la rechute de la fièvre typhoïde, j'observais l'augmentation visible du *B. satellitis*.

Sur le conseil de M. Metchnikoff, j'ai tenu à faire contrôler ces données si intéressantes par un de mes camarades du laboratoire, M. le Dr Schiller. Comme moi, il n'a pu rencontrer cette espèce que dans des cas de typhoïdes confirmés, et il a pu vérifier ces caractères morphologiques et chimiques.

Par contre, il n'a pu obtenir d'espèces virulentes et n'a, par conséquent, pu reproduire les ulcérations des plaques de Peyer que je viens de décrire. Du reste, j'ai pu exalter la virulence par les passages d'un de ces échantillons.

J'ai retrouvé ce bacille à l'état de pureté dans l'exsudat péritonéal et dans le sang du cœur chez les cobayes tués par ce microbe. Les nombreuses recherches dans le sang des malades typhiques n'ont donné aucun résultat.

D'une façon générale, j'ai remarqué l'abondance de ce microbe au commencement de la maladie et la diminution à la fin, en examinant les selles de différents malades dans les périodes d'état et de convalescence.

RÔLE DE CES DIVERS MICROBES AU COURS DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE.

Nous devons nous demander maintenant si ces microbes viennent aggraver la maladie par leur action pathogène ou fermentative, ou bien s'ils ne sont que des saprophytes sans importance, dont la virulence est passagèrement augmentée.

Tout d'abord, le simple examen de leurs diverses propriétés

montre que ce sont des bactéries autrement plus redoutables que les saprophytes normaux.

A côté du *B. perfringens* banal, nous trouvons cette variété si curieuse, dont toutes les propriétés chimiques et biologiques sont fort importantes. Il a les propriétés du bacille normal considérablement accrues. Nous trouvons enfin ce *B. satellitis* qui, en dehors de son action pathogène, est grand producteur de phénol et d'indol.

S'il ne s'agissait pourtant que de quelques échantillons de chacune de ces deux espèces, le mal produit serait de peu d'importance. Il faut avouer qu'il en serait tout autrement si leur nombre était grand relativement aux autres bactéries.

Pour nous rendre compte de leur nombre dans les selles des malades, nous avons d'abord tenté une énumération sur les préparations microscopiques. Nous avons vite abandonné ce procédé, car nous pourrions compter comme espèces mauvaises des saprophytes inoffensifs et peut-être même utiles.

B. acidophilus, *Exilis*, rappelle tout au premier coup d'œil l'aspect microscopique de nos microorganismes. J'ai préféré compter dans un poids donné de selles le nombre de spores susceptibles de germer. J'ai dilué avec le plus grand soin jusqu'à production d'un trouble homogène, une quantité quelconque de matières fécales prises avec une spatule en platine, dans un tube contenant 5 c. c. rigoureusement mesurés de bouillon stérile, je pesais de nouveau. La différence jusqu'au demi-milligramme me donnait le poids de selles introduites. Je prenais 1 c. c. de cette dilution que je répartissais dans une dizaine de tubes de gélose liquide porté à 100 degrés.

Après vingt-quatre heures d'étuve, je comptais les colonies développées dans tous les tubes. Un simple calcul me permettait de ramener leur nombre à un milligramme de selles.

Par ce procédé, j'ai étudié 25 cas normaux et pathologiques. En comparant ces résultats avec les examens microscopiques, j'ai pu me rendre compte que le nombre des spores était dans un rapport à peu près constant avec le nombre des gros bâtonnets visibles. Ainsi donc, les selles de jeunes enfants ne contenaient que de gros bacilles, je trouvais rarement beaucoup de spores par milligramme.

Chez un adulte dont les selles paraissaient plus riches, j'en

trouvais 5 à 10 par milligramme ; après une purge par le sulfate de magnésie qui avait fait disparaître ce gros bâtonnet, je ne trouvais plus de spores.

Au cours de la fièvre typhoïde, j'ai toujours trouvé plus de spores dans les selles que chez l'adulte sain.

J'ai rencontré plus de spores dans la dernière période de la maladie que dans le premier septénaire, plus également dans les cas graves que dans les cas bénins. Chez les malades où il m'a été possible de répéter souvent les examens, j'ai vu ce nombre augmenter avec la durée de la maladie pour atteindre un maximum dans le dernier septénaire. Enfin, dans les cas où les troubles d'intoxication semblaient prendre le dessus sur les troubles gastro-intestinaux, le nombre des spores était insignifiant.

Dans un cas très grave observé par M. Tissier, terminé par la mort, où la dyspnée précoce, la respiration à type Cheyne-Stocke, l'irrégularité et la précipitation du pouls, la température élevée à 40 degrés dès le premier jour indiquant une forme des plus toxiques et où les selles sans odeur, à peine liquides, au nombre de une à deux fois par jour au plus, révélaient à peine quelques troubles intestinaux, il était impossible de trouver des spores dans un milligramme de selles.

On ne voyait à l'examen microscopique que quelques bacilles. Il existait certainement de ces bactéries à spores, puisque les cultures en bouillon blanc d'œuf nous en ont démontré la présence, mais le nombre ne semblait pas considérable.

En général, on peut dire, en mettant de côté ces formes hyper-toxiques, que ces microorganismes sont nombreux dans les selles typhiques et que par conséquent leur action ne paraît pas négligeable.

La présence, dans les urines des malades, d'indican et de phénolsulfates en abondance avec une alimentation des plus réduites et, la plupart du temps, lactée, ne montre-t-elle pas la présence, dans l'intestin, de nombreuses bactéries productrices d'indol et de phénol, comme ce sont d'abord la variété du *B. perfringens* et surtout le *B. satellitis*.

Mais ces deux bacilles n'ont pas, comme seul inconvénient de produire ces substances dangereuses pour l'organisme, ils

produisent aussi des toxines et semblent même avoir une action particulière sur le tissu lymphoïde.

En comparant leur action nuisible, on voit que le dernier doit surtout retenir notre attention.

La variété de *B. perfringens* donne de l'indol et beaucoup de phénol. Il produit également, par injection d'une de ses cultures dans le péritoine, de graves accidents amenant la mort rapide de l'animal.

La muqueuse intestinale, les plaques de Peyer sont tuméfiées, gonflées, hyperémiées, mais ne sont pas ulcérées.

Le bacille Satellite possède une action plus importante. Il donne plus d'indol et tout autant de phénol que le précédent. Il occasionne également la mort de l'animal, mais il cause en plus l'ulcération des plaques de Peyer.

Quand on compare son action avec celle du bacille d'Eberth, on voit qu'à virulence égale l'action sur le tissu lymphoïde est beaucoup plus marquée avec le *satellititis*.

Le *B. satellitis* et la variété de *B. perfringens*, réunis au bacille typhique, injectés dans le péritoine, occasionnent la mort rapide de l'animal. A l'autopsie, la séreuse est couverte de liquide séro-sanguinolent. Tous les organes abdominaux sont hyperémiés, la rate est tuméfiée. La muqueuse intestinale est gonflée, rougeâtre; les plaques de Peyer sont rouges et quelques-unes sont ulcérées. Nous avons fait de nombreuses expériences, en réunissant tour à tour le *B. satellitis* au *B. perfringens* ou le *B. satellitis* avec le bacille d'Eberth.

Nous n'avons jamais obtenu d'ulcération des plaques de Peyer que quand le *B. satellitis* était contenu dans le mélange. D'après ce que nous venons de dire, il semble qu'on doive attribuer à ce *B. satellitis* un rôle important dans la fièvre typhoïde.

On sait, depuis les nombreux travaux des hygiénistes sur les origines de la fièvre typhoïde, le rôle joué par les huîtres. De nombreux cas observés en hiver et au printemps sont à l'heure actuelle attribués à l'ingestion d'huîtres.

J'ai cherché à la station zoologique de Wimereux (1) si ces mollusques contenaient le bacille d'Eberth ou le *B. satellitis*.

J'ai pu me rendre compte que sur une cinquantaine d'huî-

(1) Grâce à la bienveillante permission du Professeur Caullery.

tres, prises en dehors de toutes souillures, dans un parc artificiel et bien entretenu, l'eau qui baigne le mollusque dans sa coquille est stérile ou presque. Le contenu de l'intestin recueilli par l'anus contient aussi très peu de microbes aérobies ; mais le contenu de l'estomac renfermait dans la majorité des cas le *B. satellitis*. Je n'ai pu, par contre, jamais rencontrer ni le bacille d'Eberth ni le *B. coli*.

D'après tout ce que nous venons de dire, il est permis de supposer dans la fièvre typhoïde deux processus distincts. L'un, de type septicémique, dû à l'action d'un microbe, le bacille d'Eberth pouvant vivre dans la circulation générale ou dans les organes hématopoiétiques ; l'autre, de type nécrosant, se passant uniquement dans la partie de l'intestin privé d'air, dans la région iléo-cæcale causé par un anaérobie strict protéolytique puissant, le *B. satellitis*.

Ordinairement ces deux processus évolueraient ensemble, les deux microbes se trouvant ensemble dans l'intestin. Il arriverait parfois que, suivant certaines circonstances, l'un des deux, plus virulent, prendrait le pas sur son commensal, ce qui produirait ces formes cliniques si bien connues des médecins et apparaîtrait dans la même épidémie à forme toxique ou forme intestinale.

Ce ne sont encore que des hypothèses, mais les données de nos expériences permettent de les formuler.

Je me propose, du reste, de continuer mes recherches sur ce point.

QUELQUES PROPRIÉTÉS NOUVELLES DU CATALYSEUR DIT « PEROXYDASE ».

RAPPROCHEMENT ENTRE SON ACTION ET CELLE DES NITRITES

par M. J. WOLFF.

(Travail du laboratoire de M. A. Fernbach.)

I

On sait que les catalyseurs naturels peuvent jouer un rôle important au cours du développement des végétaux. La peroxydase, étant l'un des enzymes les plus répandus du règne végétal, a déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Bach et Chodat notamment se sont beaucoup occupés de cette question (1). D'après eux, les peroxydases ne peuvent agir qu'en présence de peroxydes (2). Le rôle physiologique de ces catalyseurs serait-il donc intimement lié à la présence des peroxydes dans les cellules végétales? G. Bertrand s'élève avec raison contre cette manière de voir (3). Ce n'est pas, en effet, parce que les peroxydases ont la propriété de produire *in vitro* certaines réactions avec H_2O_2 qu'elles doivent nécessairement se comporter de même *in vivo*. Néanmoins, la plupart des physiologistes admettent comme une nécessité la présence des peroxydes dans les sucres végétaux pour expliquer le fonctionnement des peroxydases (4).

On sait depuis longtemps que les peroxydes déplacent l'iode

(1) A. BACH, Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXXIV, p. 251.

(2) A. BACH und R. CHODAT, *Ueber Peroxydbildung in der lebenden Zelle. Berichte*, t. XXV, p. 2466, 1902.

(3) G. BERTRAND et M^{lle} ROZENBAND, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, avril 1909.

(4) KASTLE et LOEWENHARDT, *Ann. chem. Journ.*, t. XXVI, p. 539. — S. KOSTYT-CHEW, *Zeitsch. f. phys. Ch.*, 67, p. 131.

des iodures (1). On a utilisé cette propriété dans l'emploi du papier réactif à l'iode de potassium amidonné. Kastle et Lœwenhardt se sont servis de ce réactif pour déceler des peroxydes dans les végétaux, mais Aso (2) a contesté l'interprétation donnée par ces auteurs à leurs expériences et il a cité des exemples où les nitrites contenus dans les plantes se comportent comme les peroxydes vis-à-vis du réactif ioduré; il est d'avis que ce sont les nitrites qui déplacent l'iode; il cite à ce propos les bourgeons de *Sagittaria*, où il a pu mettre les nitrites en évidence. Chodat et Bach (3) ont repris les expériences de Kastle et Lœwenhardt et ils ont pu déceler des peroxydes dans un certain nombre d'espèces végétales, notamment sous la couche épidermique des enveloppes de pommes de terre. Pour répondre aux objections d'Aso, ils ont soumis le suc végétal rapidement extrait au réactif de Griess, si sensible à l'action des nitrites. N'ayant observé aucune coloration, ils en conclurent qu'il n'y avait pas lieu de mettre en doute l'existence des peroxydes. Les choses en étaient là lorsque récemment M. P. Mazé (4) montra que la sève des végétaux supérieurs renferme toujours des nitrites. Pour les mettre en évidence, il alcalinise rapidement les sucs végétaux de manière à empêcher : 1° la mise en liberté de l'acide nitreux par l'acidité naturelle du suc; 2° la réduction de l'acide nitreux sous l'influence des substances oxydables de ce suc. Il concentre son jus, et, après l'avoir rendu acide, il le soumet à la distillation. Le liquide qui passe donne toujours avec le réactif de Griess la coloration caractéristique de l'acide nitreux. On voit donc que si Bach et Chodat n'ont pas observé la réaction des nitrites avec le réactif de Griess, c'est peut-être à cause de la rapidité avec laquelle ces sels sont décomposés et réduits par les sucs plus ou moins acides de la plante. Néanmoins, la présence des nitrites dans la sève des végétaux n'exclut pas celle des peroxydes sous la

(1) L'acide nitreux possède également la propriété de déplacer l'iode des iodures. Laurent a utilisé cette réaction pour doser les nitrites dans les sucs végétaux. — EM. LAURENT, Expériences sur la réduction des nitrates par les végétaux. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. IV, p. 722, 1890.

(2) Aso, *Beihfte z. bot. Centralbl.*, t. XV, p. 208 à 214.

(3) R. CHODAT, *Abderhalden'sche Biochem. Arbeitsmethoden*, 4, 44.

(4) P. MAZÉ, Recherches sur la présence d'acide nitreux dans la sève des végétaux supérieurs. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLV, p. 781, octobre 1912.

couche épidermique de quelques enveloppes de fruits ou de tubercules. Je me propose de donner ailleurs quelques précisions à cet égard. Quoi qu'il en soit, le fait mis en évidence par M. Mazé, c'est-à-dire la présence si générale des nitrites dans les végétaux (1), a une importance capitale au point de vue des phénomènes d'oxydation intracellulaire. De plus, grâce à la faible acidité de la sève, l'acide nitreux est mis en liberté et peut provoquer dans les tissus des végétaux des oxydations beaucoup plus énergiques que s'il restait à l'état de nitrite. En faisant agir des extraits végétaux (2) sur une solution de nitrite de potassium, j'ai pu obtenir, en présence de gaïacol, une formation lente de tétragaïaquinone. Lorsqu'on soumet séparément ce phénol à l'action d'un nitrite ou d'une macération végétale, on n'observe rien. J'ai pu également oxyder l'orcine et d'autres composés phénoliques à l'aide du mélange de nitrite et de suc. Je n'ai pas encore essayé d'oxyder dans les mêmes conditions des sucres, des alcools et des aldéhydes. On obtient des résultats identiques à ceux que je viens de signaler si on remplace, toutes choses égales d'ailleurs, les macérations végétales par des traces d'un phosphate acide ou d'un citrate acide.

Je démontrerai d'autre part au cours de ce mémoire que le concours des peroxydes n'est nullement indispensable au fonctionnement des peroxydases et que ces enzymes sont à même d'exercer une action catalytique énergétique par un mécanisme différent.

En présence de ces faits, on est en droit de se demander si vraiment les peroxydes, que l'on ne rencontre que rarement associés aux peroxydases, ont l'importance qu'on leur a accordée jusqu'ici dans les phénomènes respiratoires dont les végétaux sont le siège.

(1) EM. LAURENT a signalé, dès 1890, la propriété que possèdent les sucres végétaux de réduire les nitrates en nitrites, et il attribue la présence des nitrites qu'il a rencontrés dans quelques végétaux (pomme de terre, radis rose) à la réduction des nitrates contenus normalement dans le suc. (*Loc. cit.*)

(2) L'extrait des jeunes pousses d'orge peut se prêter très bien à ces expériences à la condition de l'employer à des doses relativement massives. Ce sont les sels, acides à la phthaléine, contenus dans l'extrait, qui déplacent l'acide nitreux. Pour mesurer l'acidité, il suffit de neutraliser en présence de phthaléine un volume déterminé de macération à l'aide d'une solution N/10 de soude. 5 cent. cubes demandent 16 c. c. de soude N/10.

Quant aux peroxydases elles-mêmes, on ne sait pas comment elles réagissent *in vivo* ; on ignore même sur quelles substances pourrait porter leur action dans les végétaux.

En effet, les corps que ces catalyseurs attaquent *in vitro* sont extrêmement rares dans les tissus des plantes. Ces considérations sont donc de nature à jeter également un doute sur la valeur physiologique des peroxydases, et l'on est autorisé à se demander si, à la vérité, elles contribuent d'une façon quelconque à l'élaboration ou à la transformation des sucres et des tissus végétaux (1). Néanmoins, on n'a pas le droit d'affirmer qu'elles sont sans aucune utilité. Il se peut fort bien que l'on ne connaisse pas encore le mécanisme par lequel elles agissent *in vivo*, ni les substances qui subissent leur action. Palladin (2) attribue aux pigments ou substances chromogènes un rôle prépondérant dans les phénomènes respiratoires de la cellule vivante ; d'après lui, les pigments prendraient naissance sous l'influence des oxydases et des peroxydases. Quoi qu'il en soit, l'étude de la peroxydase présente un intérêt très réel au point de vue des propriétés générales des diastases. C'est ce que je me propose de démontrer dans le présent mémoire.

II

Les différents auteurs qui ont étudié la peroxydase ont extrait ce catalyseur du raifort, du son, etc.

J'ai donné la préférence aux jeunes pousses d'orge. Celles-ci contiennent un catalyseur commode à extraire et la macération diastasique obtenue ne renferme, en dehors de la peroxydase, ni amylase, ni laccase, ni tyrosinase, ni catalase.

Il est probable qu'en s'adressant à d'autres graines que l'on peut se procurer aussi facilement que l'orge, on obtiendrait des résultats semblables.

(1) On est d'ailleurs autorisé à formuler les mêmes réserves vis-à-vis du rôle physiologique des oxydases les mieux connus (laccase, tyrosinase). En effet, les phénomènes d'oxydation qui se manifestent dans les végétaux sous l'influence de ces enzymes ne s'observent en général qu'après la mort des cellules (fèves, pomme de terre, bolets, racines de chicorée, etc.).

(2) PALLADIN, Ueber die Bedeutung der Atmungspigmente in den Oxydationsprozessen der Pflanzen und Tiere. *Zeitschrift f. Gärungsphysiologie*, t. I, mai 1912.

On laisse la germination se faire à l'obscurité pour éviter la formation de pigments qui pourraient colorer l'extrait diastasique. Lorsque la plante a atteint une hauteur de 0^m1 à 0^m15, on la coupe au ras du grain, on la broie énergiquement dans un mortier avec son poids d'eau, puis on fait passer le liquide par pression à travers une toile. On filtre ensuite sur papier Berzélius (exempt de fer) jusqu'à ce que le liquide passe clair. Pour éviter l'infection microbienne, on verse du toluène sur le filtre et dans le récipient. On obtient ainsi un liquide clair, à peine coloré et très actif. La macération est alors abandonnée à elle-même pendant 5 ou 6 jours; dans ces conditions, elle se dépouille de la plus grande partie des matières albuminoïdes qu'elle renferme. On la filtre de nouveau sur papier Berzélius et on la conserve sous une couche de toluène de 2 à 3 millimètres d'épaisseur.

Je me suis proposé tout d'abord d'étudier la résistance que peut offrir la peroxydase aux alcalis et aux acides. L'influence exercée par divers acides sur ce catalyseur a déjà fait l'objet de recherches détaillées de la part de M. Gabriel Bertrand et de M^{lle} Rozenband (1); mais ceux-ci ont envisagé la question d'un point de vue différent du mien; en effet, ils ont comparé l'effet nuisible produit par divers acides et sels acides sur la peroxydase pendant la phase initiale, nécessairement très courte, de la réaction. D'autre part, la question relative à l'influence exercée sur la peroxydase par les alcalis n'a même pas été examinée par ces auteurs. Mon attention s'est donc portée plus particulièrement sur ce dernier point, le seul d'ailleurs qui, dans mes expériences, se soit montré susceptible de quelque développement.

Dans mes quatre expériences initiales, je mets en contact dans des tubes à essai 1 cent. cube de macération diastasique avec 3 cent. cubes des solutions normales suivantes : acide sulfurique, acide phosphorique, soude, ammoniacque. Je prélève de quart d'heure en quart d'heure 0,2 cent. cube du liquide de chaque tube et j'examine celui-ci au point de vue de la réaction qu'il donne avec le gaïacol et l'eau oxygénée. J'ai soin d'opérer toujours en présence d'un excès de phosphate acide de potassium.

Dans ces conditions, on observe une destruction très rapide de l'enzyme par les acides sulfurique et phosphorique. Sa résistance à la soude est déjà considérable. Après trois heures de contact, la réaction avec le gaïacol est encore très nette et ce n'est que vers la dixième heure que l'on constate la destruction complète de l'enzyme. Vis-à-vis de l'ammoniacque,

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, avril 1909.

la résistance de la peroxydase est très grande, puisque, au bout de vingt-quatre heures de contact, la réaction avec le gaïacol n'a rien perdu de son énergie.

A mesure que l'on diminue la concentration des acides et de la soude, on constate une résistance de plus en plus grande de la peroxydase à ces agents, mais cette résistance n'atteint jamais dans mes expériences celle qu'on observe pour des doses, même massives, d'ammoniaque. Ainsi avec une dose trente fois moindre d'acide que celle qui a été employée dans les expériences initiales, on constate pour :

SO⁴H².

Après 1 heure de contact Réaction très faible.
Après 2 heures de contact : Réaction presque nulle.
Après 24 heures de contact Réaction nulle.

PO⁴H³.

Après 1 heure de contact Réaction très intense.
Après 2 heures de contact Réaction très intense.
Après 24 heures de contact Réaction presque nulle.

En employant une dose de soude seulement trois fois plus faible que dans l'expérience initiale, la réaction avec le gaïacol est encore très intense après quarante-huit heures.

Il se dégage de ces observations que : 1° la peroxydase résiste beaucoup mieux aux alcalis qu'aux acides ; 2° la destruction de l'enzyme est plus rapide par l'acide sulfurique que par l'acide phosphorique ; 3° le catalyseur résiste beaucoup mieux à l'ammoniaque qu'à la soude.

La lenteur avec laquelle la peroxydase est attaquée par l'ammoniaque est un fait inattendu et digne d'attention, et j'ai pensé qu'il serait peut-être intéressant d'examiner l'énergie de la peroxydase au fur et à mesure que son temps de contact avec l'ammoniaque s'accroît.

J'ai choisi le gaïacol comme substratum d'oxydation et j'ai basé mon appréciation sur la rapidité et l'intensité de la réaction colorée que ce phénol fournit en présence de la peroxydase et de H²O².

Mode opératoire. — On mélange 1 cent. cube de macération diastasique A avec 3 cent. cubes d'ammoniaque normale et l'on abandonne le mélange B à l'ombre vers 16 degrés dans un tube à essai bien bouché. On prélève à

intervalles réguliers (1) 0,1 cent. cube du mélange B renfermant 0,025 cent. cube de la macération A. On prépare en même temps deux types témoins C et D avec 0,025 cent. cube de macération A.

Les trois prises d'essai B, C, D sont introduites dans des tubes à essai. Dans C, on ajoute 0,1 cent. cube d'une solution obtenue en étendant 3 cent. cubes d'ammoniaque normale de 1 cent. cube d'eau distillée et on obtient ainsi un type C renfermant la même dose d'ammoniaque que B. On additionne ensuite B et C de 6 gouttes; D de 1 goutte de solution à 10 p. 100 de phosphate acide de potassium, de manière à opérer toujours en présence d'un petit excès de ce sel. On verse alors dans les trois tubes 1 cent. cube d'une solution de gaiacol à 1,5 p. 100 et on complète avec de l'eau distillée de manière à avoir partout 2 cent. cubes; enfin on ajoute rapidement dans les trois tubes 1 goutte de H_2O^2 neutre à 2 volumes.

Dans ces conditions, la marche de la réaction dans D mesure invariablement l'activité primitive, tandis que dans C elle mesure l'activité immédiatement après l'addition de NH^3 . Il est facile dès lors d'apprécier par comparaison les modifications qui surviennent avec le temps dans le mélange B.

L'étude des diverses phases du phénomène conduit aux conclusions suivantes :

1° Dès le contact avec l'ammoniaque, la peroxydase perd une partie de son activité, puis, à mesure que le temps de contact s'accroît, la peroxydase agit de plus en plus vite et, au bout de quatre à cinq heures, elle a repris son activité primitive.

2° Cette activité continue à augmenter pour atteindre son maximum vers la quatorzième heure, moment où elle est environ le double de l'activité primitive, puis, lorsque l'optimum est atteint, la vitesse de la réaction se maintient sensiblement pendant quelques heures au même niveau pour décroître ensuite lentement.

3° Au bout du onzième jour, l'intensité de la réaction est très affaiblie et elle est comparable à ce qu'elle était au moment du contact de la peroxydase avec l'ammoniaque (en 1).

Le mélange de 1 cent. cube de macération diastasique avec 3 cent. cubes d'une solution *décinormale* de soude peut donner lieu à des phénomènes analogues, mais la destruction du catalyseur étant beaucoup plus rapide qu'avec la solution *normale* d'ammoniaque, on ne les observe que sous une forme très atténuée.

Avec les acides sulfurique et phosphorique, même très

(1) Au début, toutes les heures, puis de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures.

étendus, ces phénomènes ne se produisent pas, ou, du moins, je n'ai pu les observer.

Dans les expériences que je viens de décrire, je me suis servi comme réactif du gaïacol. Lorsqu'on s'adresse à d'autres phénols, tels que le pyrogallol ou l'hydroquinone, le phénomène ne se passe pas tout à fait de la même façon; en effet, on observe une activation immédiate de la peroxydase lorsque, en présence de celle-ci et d'un excès de phosphate acide, on introduit dans le milieu une petite quantité de soude ou d'ammoniaque. Un contact plus ou moins prolongé de l'enzyme avec l'ammoniaque n'a pas pour effet de faire varier l'intensité de la réaction, comme cela a lieu dans le cas du gaïacol. On se rend compte, par cet exemple, que la substance qui subit l'action de l'enzyme est plus sensible aux influences du milieu que l'enzyme lui-même. J'avais déjà attiré l'attention sur ce fait dans une publication antérieure à propos de la laccase et des oxydations qu'elle provoque (1). Une étude récente de A. Bach et M^{lle} Maryanovitch vient confirmer pleinement cette manière de voir (2).

Enfin, il se dégage de mes expériences que les bases alcalines, qu'elles agissent soit à l'état libre, soit à l'état combiné, sont un des facteurs principaux des phénomènes d'activation analysés ici.

III

SUR LE FONCTIONNEMENT DES PEROXYDASES EN L'ABSENCE DE PEROXYDES.

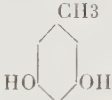
La question traitée dans ce chapitre demande un certain développement. J'ai déjà dit au début de ce mémoire que les peroxydases sont capables de jouer un rôle important comme catalyseurs sans le concours de peroxydes. Je vais le démontrer. On connaît depuis longtemps la propriété des bases alcalines qui consiste à fixer sur certains phénols l'oxygène atmosphérique. D'autre part, j'ai montré dans le chapitre précédent que,

(1) *Thèse de doctorat*, Paris, avril 1910, p. 67.

(2) *Archives des Sciences physiques et naturelles*, t. XXXIII, Genève, 1912.

non seulement la peroxydase n'est attaquée qu'avec lenteur par les alcalis, mais que ceux-ci peuvent encore exercer une action excitante sur l'enzyme. De là est née dans mon esprit l'idée d'associer l'action de l'alcali et de la peroxydase dans l'oxydation des polyphénols. J'ai vu ainsi que la peroxydase est capable d'accélérer d'une façon considérable les oxydations provoquées par de faibles doses d'alcalis ou de sels alcalins sans le concours de H^2O^2 .

Pour le démontrer, j'ai choisi comme substratum d'oxydation l'orcine qui se prête d'une façon toute particulière à ce genre

d'expériences. Ce phénol  fixe, on le sait, l'oxygène de

l'air en présence des alcalis, des carbonates alcalins, etc.; mais nous verrons dans la suite que, sous l'influence combinée de ces composés et de la peroxydase, l'orcine peut absorber une quantité d'oxygène atmosphérique beaucoup plus forte.

Pour mesurer les absorptions d'oxygène, je me sers, comme dans mes expériences précédentes, de cloches à gaz de même capacité et de même diamètre (110 cent. cubes). Elles sont graduées jusqu'à 100 cent. cubes et peuvent mesurer le quart d'un cent. cube. Ces cloches, après avoir été préparées pour l'expérience, sont bouchées hermétiquement et disposées horizontalement. Les solutions qu'elles contiennent présentent ainsi une grande surface d'absorption (1).

Voici quelques résultats obtenus après vingt-quatre heures de contact à la température de 20 degrés centigrades :

ORCINE	VOLUME TOTAL du liquide.	EXTRAIT diastasique.	NaOH normal.	GAZ total.	OXYGÈNE absorbé.
1. 0 gr. 28 .	15 c. c.	0 c. c. 0	0 c. c. 5	95 c. c.	3 c. c. 8
2. 0 gr. 28 .	15 c. c.	1 c. c. »	0 c. c. 5	95 c. c.	10 c. c. 5
3. 0 gr. 28 .	15 c. c.	0 c. c. 0	0 c. c. 25	95 c. c.	1 c. c. 5
4. 0 gr. 28 .	15 c. c.	1 c. c. »	0 c. c. 25	95 c. c.	7 c. c. 5

En se plaçant dans les meilleures conditions (au point de vue de l'action accélératrice de la peroxydase), on observe une absorption d'oxygène environ cinq fois plus forte en présence

(1) Pour plus de détails, consulter ma thèse. Paris, 1910, p. 18.

de ce catalyseur qu'en son absence. Nous avons, M. Ruot et moi, répété les expériences III et IV en employant les mêmes proportions relatives d'orcine, de soude, de macération diastatique et d'eau, mais en opérant sur une plus grande échelle et en nous entourant des précautions les plus minutieuses pour éviter les causes d'erreur. Ces expériences ont été faites dans de grands matras en verre d'une capacité voisine de 900 cent. cubes.

Après vingt-quatre heures de contact à 20 C., le volume des gaz a été mesuré et on en a prélevé une partie pour l'analyse dans l'eudiomètre. Les volumes ont été ramenés à 0 et à la pression de 760 millimètres.

ORCINE	VOLUME TOTAL du liquide.	EXTRAIT diastatique.	NaOH normal.	GAZ total.	OXYGÈNE absorbé.
—	—	—	—	—	—
1 gr. 42.	40 c.c.	0 c.c.	1 c.c.	801 c.c. »	40 c.c. 24
1 gr. 42.	40 c.c.	4 c.c.	1 c.c.	889 c.c. 8	39 c.c. 51

Nous voyons ainsi que la peroxydase est à même de jouer un rôle important comme catalyseur sans qu'il soit besoin de lui adjoindre un peroxyde.

Si, au lieu de soude, on emploie du carbonate de sodium ou de l'ammoniaque, on obtient des résultats dans le même sens, comme l'indique le tableau suivant :

ORCINE	VOLUME TOTAL du liquide.	EXTRAIT diastatique.	CO ³ Na ² normal.	AMMONIAQUE normale.	GAZ total.	OXYGÈNE absorbé.
—	—	—	—	—	—	—
0 gr. 28.	45 c.c.	0 c.c.	0 c.c. 5	»	95 c.c.	4 c.c.
0 gr. 28.	45 c.c.	1 c.c.	0 c.c. 5	»	95 c.c.	9 c.c.
0 gr. 28.	45 c.c.	0 c.c.	»	0 c.c. 25	95 c.c.	3 c.c.
0 ge. 28.	45 c.c.	1 c.c.	»	0 c.c. 25	95 c.c.	6 c.c.

J'ai également fait avec le phosphate disodique quelques expériences qui montrent que ce sel, quoique très peu favorable à l'oxydation de l'orcine, peut amorcer la réaction en présence de la peroxydase. Ainsi, en faisant agir 56 milligr. 8 de phosphate cristallisé sur 0,7 grammes d'orcine dans 25 cent. cubes d'eau, on ne constate après quarante-huit heures qu'une absorption de 0,6 cent. cubes d'oxygène. La même expérience, faite en présence de 3 cent. cubes de peroxydase, a donné lieu à une absorption de 5 cent. cubes de gaz.

Les sels de manganèse, qui n'oxydent l'orcine qu'avec une extrême lenteur, voient leur action considérablement accrue par l'addition d'extrait diastasique; mais c'est la réaction du milieu qui joue ici le rôle capital.

Tous les polyphénols ne se prêtent pas aussi bien que l'orcine à ces expériences; cependant la résorcine, qui se rapproche beaucoup de l'orcine par sa constitution (les 2OH en méta) mais ne renferme pas de groupe méthyle, se comporte sensiblement comme ce dernier phénol: toutefois, les phénomènes d'oxydation que l'on observe avec la résorcine sont moins énergiques. Voici un tableau qui met ces faits en lumière.

On opère pour les deux phénols sur 2,28 grammes de matière :

	VOLUME TOTAL du liquide.	EXTRAIT diastasique.	NaOH normal.	GAZ total.	OXYGÈNE absorbé.
Orcine. . .	15 c. c.	0 c. c.	1 c. c.	95 c. c.	7 c. c. 8
Orcine. . .	15 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	95 c. c.	13 c. c. »
Résorcine .	15 c. c.	0 c. c.	1 c. c.	95 c. c.	2 c. c. 6
Résorcine .	15 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	95 c. c.	3 c. c. 5
Résorcine .	15 c. c.	4 c. c.	1 c. c.	95 c. c.	5 c. c. 6

Dans d'autres expériences où, au lieu de soude, on a employé de l'ammoniaque, on observe des écarts analogues. On est donc conduit à penser que le groupe CH_2 , qui seul différencie les deux phénols, favorise beaucoup la fixation d'oxygène.

L'analogie dans la constitution et le fonctionnement de ces deux phénols permettait de prévoir d'autres propriétés communes à ces composés. C'est ainsi que, sous l'influence combinée de l'ammoniaque, de l'oxygène et de l'eau, ils peuvent former tous deux de belles matières colorantes : l'une, rouge, l'orcine, connue depuis les travaux de Robiquet, dérivant de l'orcine; l'autre bleue, dérivant de la résorcine (1).

(1) Cette matière colorante s'extrait facilement par l'alcool amylique. Elle vire au rouge par les acides.

IV

 INFLUENCE DE LA PEROXYDASE ET DES SURFACES DE CONTACT
 AVEC L'AIR DANS LA TRANSFORMATION DE L'ORCINE EN ORCÉINE.

Nous venons de voir que la fixation d'oxygène sur l'orcine par les alcalis peut être considérablement accélérée par l'adjonction d'une peroxydase. Le rôle de la peroxydase ne se borne pas à une action accélératrice sur la fixation de l'oxygène atmosphérique, elle peut influer encore sur la nature des produits formés, mais cette influence ne devient sensible que si l'on opère en liqueur étendue. C'est ainsi qu'en étudiant l'action combinée de l'ammoniaque et de la peroxydase sur des solutions d'orcine de faible concentration, j'ai été amené à faire quelques observations curieuses sur les conditions qui peuvent favoriser le passage de l'orcine à l'orcéine, cette belle matière colorante qui est la base de l'orseille du commerce (1).

Voici quelques expériences qui montrent l'influence que peuvent exercer sur la transformation de l'orcine en orcéine :
 1° la surface de contact avec l'air; 2° la présence de peroxydase.

Dans les quatre essais rapportés ci-dessous, j'ai employé 2 cent. cubes d'une solution d'orcine à 2,8 p. 100, 6 gouttes d'ammoniaque concentrée et, pour deux de ces essais, 1 cent. cube d'une solution de peroxydase.

I. — Au large contact de l'air (matras).

- | | |
|--|------------------------|
| A. NH^3 seule. | Coloration rouge brun. |
| B. NH^3 + 1 c.c. de peroxydase. . . . | Coloration rouge brun. |

II. — En profondeur (tube à essai).

- | | |
|--|-----------------------------|
| C. NH^3 seule | Formation lente d'orcéine. |
| D. NH^3 + 1 c.c. de peroxydase. . . . | Formation rapide d'orcéine. |

On étend l'eau de manière à avoir partout un volume total de 3,5 cent. cubes.

Déjà après quelques minutes, l'accélération de la réaction se manifeste par

(1) Robiquet est le premier qui réalisa la transformation d'une substance qu'il retira de certains végétaux et qu'il désigna sous le nom d'orcine, en une matière colorante qu'il nomma orcéine. Il obtint cette transformation sous l'influence combinée de l'ammoniaque de l'air et de l'eau (*Annales de Chimie et de Physique*, t. LVIII, p. 320, 1835). Plus tard, J.-B. Dumas, Liebig, Gerhardt et Chancel contribuèrent à établir la constitution de l'orcéine.

une teinte plus foncée dans B et D; mais la nature des produits formés diffère essentiellement. On verra, en effet, dans la suite que :

1° Il y a absorption rapide d'oxygène par A et B.

2° Les composés d'un rouge brun qui prennent naissance n'ont rien de commun avec l'orcéine et ne teignent pas la soie (4).

3° Il y a absorption lente d'oxygène par C et D.

4° Les composés qui prennent naissance en C et D ont toutes les propriétés de l'orcéine et teignent la soie en un beau rouge carmin.

Lorsqu'on compare après cinq jours les produits C et D, on remarque entre eux une grande différence, et cette différence s'accroît encore plus si on a soin de les diluer convenablement (0,2 cent. cubes dans 100 d'eau). En effet, on constate que D communique à l'eau une belle teinte rouge violacé, tandis que C colore l'eau en rouge vineux. Ce n'est qu'après six ou sept jours que C commence à présenter les caractères de la matière colorante. Il est intéressant de faire à ce moment des essais de teinture sur soie avec C et D. Voici comment il faut procéder :

Diluer 0,4 cent. cubes de chaque produit dans 10 cent. cubes d'eau; ajouter 3 cent. cubes d'alcool à 90 et tremper dans le bain ainsi préparé un écheveau de soie du poids de 2 décigrammes; chauffer quelques minutes au bain-marie, laver et sécher. Les petits écheveaux que l'on obtient ainsi présentent des différences considérables. La nuance obtenue avec D est beaucoup plus foncée que celle obtenue avec C. Voici donc démontrée d'une façon frappante l'influence favorisante exercée par la peroxydase sur le rendement en matière colorante.

Lorsqu'on chauffe la peroxydase pendant quelques minutes à la température de 100 degrés, elle perd la propriété de hâter la formation de matière colorante.

Enfin, pour avoir une idée de la marche de l'oxydation dans mes diverses expériences, j'ai mesuré, toutes choses égales d'ailleurs, l'oxygène absorbé au large contact de l'air d'une part, l'oxygène absorbé en profondeur (surface limitée) d'autre part.

Mes expériences ont été faites en deux séries dans les cloches graduées décrites plus haut.

Dans la première série, mes cloches ont été disposées horizontalement.

Dans la seconde série, elles ont été disposées verticalement.

(4) On peut néanmoins, à côté du produit rouge brun, déceler des traces d'orcéine qui teint la soie en rose pâle.

Le tableau ci-dessous permet de se rendre compte de la marche de l'oxydation dans les deux séries d'expériences : la durée de celles-ci a été de quarante-huit heures. On a employé comme d'habitude 0,28 grammes d'orcine. Le volume total du liquide a été de 15 cent. cubes ; celui de l'air disponible de 95 cent. cubes.

Cloches disposées horizontalement.

EXTRAIT diastasique.	AMMONIAQUE normale.	OXYGÈNE absorbé.	COULEUR
—	—	—	—
0 c. c.	1 c. c.	9 c. c. 5	Rouge brun.
1 c. c.	1 c. c.	12 c. c. 9	— —
4 c. c.	1 c. c.	14 c. c. 1	— —
0 c. c.	2 c. c.	12 c. c. 8	— —

Cloches disposées verticalement.

EXTRAIT diastasique.	AMMONIAQUE normale.	OXYGÈNE absorbé.	COULEUR
—	—	—	—
0 c. c.	1 c. c.	1 c. c. 2	Rouge brun.
1 c. c.	1 c. c.	2 c. c. 4	Carminé.
4 c. c.	1 c. c.	2 c. c. »	Carminé.
0 c. c.	2 c. c.	1 c. c. 4	Rouge brun.

On voit que, dans les cloches disposées horizontalement, l'absorption d'oxygène a été sept fois plus forte que dans les cloches disposées verticalement, et cependant c'est dans les dernières que l'on observe la formation d'orcine.

Donc, c'est une oxydation relativement lente par l'ammoniaque qui est la condition première de la formation d'orcine. Lorsque, sur cette action, vient se greffer l'action favorisante de la peroxydase, celle-ci s'exerce bien plus par la formation de matière colorante que par une augmentation de l'oxygène absorbé.

V

CONCLUSIONS.

I. L'acidité des sucs végétaux (1) est suffisante pour déplacer l'acide nitreux des nitrites. L'acide nitreux mis en liberté peut

(1) Cette acidité est due à la présence de sels, acides vis-à-vis de la phtaléine.

donner lieu à des phénomènes d'oxydation analogues à ceux que l'on observe avec le système peroxydase-eau oxygénée. Le phosphate monopotassique décompose les nitrites à la manière des sucres végétaux. M. P. Mazé (1) ayant montré que les végétaux supérieurs renferment des nitrites d'une façon normale, on est autorisé à penser avec lui que ces sels peuvent jouer un rôle important dans les phénomènes d'oxydation dont les végétaux sont le siège.

II. La peroxydase peut subir très longtemps le contact de doses massives d'ammoniaque sans être notablement affaiblie.

En laissant la peroxydase en contact avec l'ammoniaque et en mesurant son activité au cours de cette action, on observe d'abord une perte de l'activité primitive, puis, à mesure que le temps de contact s'accroît, l'activité augmente.

Au bout de quatre à cinq heures, cette activité a repris sa valeur primitive.

L'intensité de la réaction continue à s'accroître et l'activité atteint son maximum vers la quatorzième heure; cette activité représente environ le double de l'activité primitive de la peroxydase.

L'activité maxima se maintient ensuite pendant quelques heures, puis elle décroît insensiblement jusqu'au onzième jour; elle est alors comparable à ce qu'elle était au moment du contact avec NH_3 .

III. On sait que l'orcine fixe l'oxygène de l'air en présence des alcalis, des carbonates alcalins, etc. J'ai montré que la quantité d'oxygène absorbé augmente beaucoup si, à l'action des alcalis et des sels alcalins, on ajoute celle de la peroxydase. En se plaçant dans les meilleures conditions, on observe une absorption d'oxygène atmosphérique cinq fois plus forte en présence de ce catalyseur qu'en son absence.

IV. En étudiant plus spécialement les effets de l'ammoniaque et de l'orcine (2) d'une part, de l'ammoniaque, de l'orcine et de

(1) *Loc. cit.*

(2) En solution étendue (1 à 2 p. 100).

la peroxydase d'autre part, on observe qu'en faisant varier les surfaces de contact des solutions avec l'air, on peut obtenir des résultats très différents, aussi bien au point de vue de la quantité d'oxygène absorbé qu'au point de vue de la qualité des produits formés.

1° Au large contact de l'air, on observe une très forte absorption d'oxygène, mais il ne se forme pas de matière colorante (orcéine) pouvant teindre la soie.

2° Lorsque la surface de contact avec l'air est très réduite, l'absorption d'oxygène est sept fois moindre environ, mais il se forme de l'orcéine.

3° La présence de la peroxydase hâte, dans le premier cas, l'absorption d'oxygène, mais ne donne pas lieu à la formation d'orcéine.

4° La présence de peroxydase n'augmente que faiblement, dans le deuxième cas, la proportion d'oxygène absorbé, mais hâte beaucoup la formation d'orcéine.

TECHNIQUE DE DOSAGE

DU GLUCOSE DANS LES MATIÈRES FÉCALES (1)

par L. H. DEJUST.

(Travail du laboratoire de M. G. Bertrand.)

De nombreux travaux ont été publiés sur la présence ou sur l'absence de sucre réducteur dans les matières fécales. La plupart d'entre eux ne fournissent aucun renseignement sur la technique suivie, se contentant d'indiquer : « on dose par la liqueur de Fehling après défécation ».

Ceux d'entre eux qui sont plus explicites indiquent deux sortes de techniques : l'une consiste à épuiser les matières par de l'eau distillée, et à traiter le liquide d'épuisement comme une urine glucosique ; l'autre consiste à traiter les matières par l'alcool, distiller le liquide d'épuisement, reprendre le résidu par l'eau, et doser le sucre dans cette solution aqueuse en utilisant son pouvoir réducteur.

Mais, à notre connaissance, aucun auteur ayant publié sur ces questions n'a fait l'expérience de contrôle qui consiste à ajouter à des selles ne contenant pas de sucre réducteur un poids de glucose exactement connu, et à effectuer dans ces matières un dosage de sucre par réduction. La concordance des deux chiffres : poids de glucose ajouté et poids de glucose retrouvé, est le seul critérium de la valeur de la méthode.

C'est par cette méthode que nous venons d'indiquer que nous avons étudié les techniques dont nous avons parlé ci-dessus.

Nous avons immédiatement abandonné la technique de l'épuisement par l'eau ; il est impossible d'épuiser par ce liquide des matières fécales, en raison de leur consistance et de leur teneur en matières grasses. Même après une longue ébullition

(1) Je remercie très vivement M. le Dr Enriquez, qui, en mettant à ma disposition les ressources de son service de la Pitié, m'a permis de me procurer les éléments de ce travail.

en présence de ce liquide, il reste toujours des fragments non désagrégés.

Blauberg, qui, cependant, a utilisé l'épuisement aqueux, s'est si bien rendu compte de cette impossibilité, qu'il recommande de commencer le traitement des matières par leur dessiccation et leur épuisement à l'éther, avant de procéder à leur épuisement par l'eau bouillante.

Les résultats que nous reproduisons plus loin montrent que la dessiccation des matières contenant du glucose entraîne une cause d'erreur qui doit la faire proscrire. La méthode de reprise par l'eau ne peut être retenue que pour des cas particuliers : ceux de selles diarrhéiques très claires, par exemple.

La seconde méthode (celle de l'épuisement alcoolique) a été indiquée par Uffelman. Après avoir préparé un extrait alcoolique, il l'évaporait, puis reprenait le résidu par l'eau, et obtenait ainsi un liquide où il caractérisait le sucre.

C'est par ce procédé que nous avons commencé notre étude, en prenant toutefois la précaution d'éliminer, par distillation dans le vide, l'alcool, de manière à éviter la surchauffe qui se produit lors de l'évaporation de l'alcool à la pression atmosphérique.

Comme nous allons le montrer, cette technique, suivie sans précautions spéciales, amène à des pertes variables, mais importantes.

Dans un matras de 750 cent. cubes, à large goulot, on introduit 50 grammes de matières, puis 20 cent. cubes d'une solution de glucose contenant 160 milligrammes de ce sucre.

On ajoute alors 250 cent. cubes d'alcool à 96 degrés, puis on porte au bain-marie, après avoir muni le goulot du matras d'un bouchon de liège percé d'un trou par où passe un tube de verre formant réfrigérant ascendant.

L'ébullition est maintenue trente minutes. Par décantation, le liquide est versé sur un entonnoir à filtration par le vide.

On recommence l'opération avec une nouvelle portion de 250 cent. cubes d'alcool, à deux reprises différentes; les trois liquides d'épuisement sont réunis; en décantant le liquide du dernier épuisement, on entraîne sur le filtre le résidu insoluble et on le rince avec quelques cent. cubes d'alcool.

Les liquides d'épuisement réunis sont distillés dans le vide de la trompe à eau jusqu'à consistance de sirop clair, lequel est repris par l'eau; cette solution est déféquée au nitrate de mercure.

L'excès de mercure est enlevé après neutralisation au moyen de poudre de zinc.

Le volume total du liquide est de 600 cent. cubes.

100 cent. cubes sont évaporés et amenés à 20 cent. cubes sur lesquels est pratiqué le dosage par la méthode de G. Bertrand.

Quantité de glucose ajoutée	166 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	153 —
Erreur en moins.	8 p. 100

Dans l'expérience suivante, pour éviter l'emploi d'aussi grandes quantités de liquide d'épuisement, on partit seulement de 25 grammes de matières et de 125 cent. cubes d'alcool. De plus, l'évaporation du liquide aqueux de reprise de l'extrait alcoolique fut menée très lentement, et à basse température.

Sauf ces deux différences, la technique suivie fut celle indiquée ci-dessus.

Quantité de glucose ajoutée	214 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	170 —
Erreur en moins	20 p. 100

SECOND ESSAI.

Quantité de glucose ajoutée	214 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	151 —
Erreur en moins	29 p. 100

TROISIÈME ESSAI.

Quantité de glucose ajoutée.	232 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	190 —
Erreur en moins	18 p. 100

QUATRIÈME ESSAI.

Quantité de glucose ajoutée.	232 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée	165 —
Erreur en moins	28 p. 100

Dans ces essais, on s'est assuré qu'il ne restait pas de sucre dans le ballon de distillation du liquide alcoolique, après la reprise par l'eau.

On fit également la remarque que le sirop restant dans le ballon présentait une réaction alcaline.

Il fallait trouver à quel stade de l'opération se produisait la perte en glucose.

a) Se produisait-elle pendant la défécation ?

Pour le savoir, on prépara un extrait alcoolique de matières fécales par la même technique que dans les essais précédents; cet extrait concentré dans le vide fournit un sirop qui, après reprise par l'eau, fut additionné de 203 milligrammes de glucose. On le traita alors par 25 cent. cubes de réactif

au nitrate de mercure. Après neutralisation à la soude, on amena à 100 cent. cubes.

Le liquide, séparé du précipité par filtration, débarrassé de l'excès de mercure par agitation avec la poudre de zinc, fut utilisé pour doser le sucre (10 cent. cubes).

Quantité de glucose ajoutée.	203 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	194 —
Erreur en moins.	4 p. 100

Etant données les proportions et les dilutions en question, le calcul montre que cette erreur correspond à une goutte de permanganate.

Ce résultat prouve que la perte en glucose ne se produit pas pendant la défécation.

b) Avait-elle lieu pendant la distillation ?

A un liquide d'épuisement par l'alcool de 25 grammes de matières (3 reprises de 125 cent. cubes chacune) exactement amené à réaction acide vis-à-vis de l'héliantine au moyen d'acide chlorhydrique au dixième en volume, on ajoute 20 cent. cubes d'une solution de glucose renfermant 203 milligrammes de ce sucre en solution très légèrement acide (1 cent. cube d'acide chlorhydrique pour 99 d'eau); on continue alors l'opération suivant la technique habituelle.

Quantité de glucose ajoutée	203 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	130 —
Erreur en moins.	35 p. 100

Il se produit donc une perte énorme pendant la distillation; quelle peut en être la cause?

En nous souvenant que le sirop restant de la distillation des liquides alcooliques présentait une réaction légèrement alcaline alors que les liquides distillés étaient de réaction légèrement acide, nous pouvions soupçonner que ce changement de milieu qui met le glucose dans des conditions défavorables est la cause de cette perte du produit à doser.

L'expérience a confirmé cette hypothèse : si nous répétons l'expérience précédente, mais en ajoutant avant la distillation, au liquide d'abord exactement neutralisé, un excès de 2 cent. cubes d'une solution d'acide chlorhydrique au dixième en volume, on obtient les résultats suivants :

Quantité de glucose ajoutée.	230 » milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée	228,5 —
Erreur en moins.	0,6 p. 100

Cette approximation correspond à moins d'une goutte de permanganate.

Nous nous croyons donc en droit de conclure que les pertes des essais précédents étaient dues à cette alcalinisation du milieu pendant la distillation.

Nous avons eu l'explication de cette alcalinisation en prenant connaissance des travaux de Mac Caughey et de Welde. Ces auteurs ont étudié les acides volatils des fèces et leur dosage ; pour extraire ces acides, ils se plaçaient justement dans les conditions où nous nous trouvions pendant la distillation de l'extrait alcoolique.

Les acidités moyennes trouvées par ces auteurs se trouvent être du même ordre de grandeur que celle que nous obtenons par l'adjonction de 2 cent. cubes d'acide chlorhydrique au dixième.

Restait à essayer la technique en ajoutant directement le glucose aux matières.

A 25 grammes de matières présentant une réaction très légèrement alcaline on ajoute 191 milligrammes de glucose ; on procède à trois épuisements de 125 cent. cubes chacun.

Les liquides alcooliques sont traités comme il a été dit ci-dessus.

Quantité de glucose ajoutée	191 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée	135 —
Erreur en moins	34 p. 100

Dans ce cas également l'influence du milieu pouvait être soupçonnée ; on répète l'expérience précédente en ayant soin d'amener à réaction acide au tournesol (à la touche), par de l'acide acétique au dixième en volume. le mélange de matière (25 grammes) et d'alcool (125 cent. cubes) avant de le porter au bain-marie.

Le reste du dosage est conduit comme ci-dessus :

Quantité de glucose ajoutée	242 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée	223 —
Erreur en moins	7 p. 100

L'erreur est plus faible, mais existe encore ; employons un léger excès d'acide ; au mélange de matières et d'alcool faisant virer au rouge le tournesol, on ajoute 5 cent. cubes d'acide acétique au dixième (en volume) ; on continue le dosage comme ci-dessus :

Quantité de glucose ajoutée	201 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée	192 —
Erreur en moins	4 p. 100

Cette erreur correspond à une goutte et demie de permanganate.

SECOND ESSAI.

Quantité de glucose ajoutée.	178 milligrammes.
Quantité de glucose retrouvée.	178 —
Erreur.	0

Il est une cause d'erreur à éviter : c'est de traiter par le nitrate de mercure et par la soude le sirop obtenu par la distillation des liquides alcooliques avant qu'il soit complètement refroidi.

Il ne faut pas non plus laisser vingt-quatre heures au contact de la poudre de zinc en milieu alcalin, ainsi que le conseillent certains auteurs.

Ces deux manières d'opérer conduisent à des pertes importantes.

Comme conclusion des observations précédentes, nous proposons la technique suivante pour doser le glucose dans les fèces, lorsqu'il y est seul corps réducteur, naturellement.

Dans un matras de 750 cent. cubes en verre de Bohême, à large goulot, on pèse 25 grammes de matières; on ajoute 125 cent. cubes d'alcool à 96 degrés; par agitation, on divise la masse des matières de façon à obtenir une suspension aussi homogène que possible, puis on verse goutte à goutte de l'acide acétique au dixième en volume jusqu'à réaction acide à la touche vis-à-vis du papier bleu de tournesol, puis 5 cent. cubes du même acide pour obtenir l'excès d'acidité voulu.

Le goulot du matras est muni d'un bouchon de liège percé d'un trou, par où passe un tube de verre long d'un mètre environ, formant réfrigérant ascendant.

On porte au bain-marie; l'ébullition est maintenue pendant quinze minutes; le liquide d'épuisement est décanté sur un filtre placé sur un entonnoir de Buchner à filtration par aspiration.

Dans le matras contenant encore la partie des matières fécales insolubles dans l'alcool, on verse à nouveau 125 cent. cubes de ce dissolvant, la réaction du mélange étant toujours maintenue acide.

On porte à nouveau au bain-marie pendant quinze minutes, on décante et on filtre comme précédemment.

Cette opération est répétée une troisième fois.

Lors de la décantation du dernier épuisement, on fait passer sur le filtre le résidu insoluble et on le lave avec environ 20 cent. cubes d'alcool.

L'extrait alcoolique ainsi obtenu est amené à réaction acide (s'il n'y est déjà) vis-à-vis de l'héliantine au moyen d'acide chlorhydrique au dixième en volume, et additionné de 2 cent. cubes de cet acide pour le même motif que ci-dessus.

On distille dans le vide de la trompe à eau, jusqu'à sirop clair; ce sirop est repris par environ 20 cent. cubes d'eau, et le liquide ainsi obtenu est versé dans un ballon jaugé de 50 cent. cubes. Le ballon de distillation est

rincé à plusieurs reprises par quelques cent. cubes d'eau, à chaud, et les liquides de lavage réunis dans le ballon jaugé.

On laisse refroidir et on ajoute 12 cent. cubes du réactif de Patein et Dufau (solution aqueuse de nitrate mercurique), puis on neutralise à la soude.

Le ballon est alors rempli jusqu'au trait de jauge avec de l'eau; on filtre et on agite vivement pendant $3/4$ d'heure environ le liquide filtré avec de la poudre de zinc (4 ou 5 grammes), on filtre à nouveau, et on détermine le pouvoir réducteur sur 20 cent. cubes (pour des quantités de l'ordre de grandeur de celles envisagées ci-dessus) par la méthode G. Bertrand.

Nous indiquerons dans une note ultérieure les applications de cette technique en physiologie et en pathologie.

Ajoutons seulement qu'il semble vraisemblable que les observations ci-dessus — et, par conséquent, la technique elle-même — doivent être applicables à l'extraction et au dosage du glucose et d'autres sucres réducteurs dans divers milieux physiologiques.

BIBLIOGRAPHIE

MAC FADYEN, NENCKI et N. SIEBER. — *Archiv für exper. Path. und Pharm.*, Bd XXVIII, p. 318 (1891).

BRAUNE. — *Virchow's Archiv*, Bd XIX, p. 489.

EWALD. — *Virchow's Archiv*, Bd LXXV, p. 412.

MAGNUS LEVY. — *Pflüger's Archiv*, Bd LIII, p. 547.

UFFELMANN. — *Deutsch. Archiv für klin. Mediz.*, Bd XXVIII, p. 463.

NAGANO. — *Pflüger's Archiv*, Bd XC, p. 389.

GRIGAUT et RICHET fils. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 2 février 1912.

RICHET fils. — Thèse de médecine : *Étude des entérites*. Paris, 1912.

ROSENFELD. — *Centralbl. für inn. Med.*, 7 février 1900.

MAC CAUGHEY. — *Hoppe Seylers Zeit.*, Bd LXXII, p. 140.

EDELSTEIN et WELDE. — *Hoppe Seylers Zeit.*, Bd LXXIII, p. 152.

SRASSBURGER et SCHMIDT. — *Die Füces des Menschen*.

LE TRÉPONÈME

DANS LE CERVEAU DES PARALYTIQUES GÉNÉRAUX

par C. LEVADITI, A. MARIE (de Villejuif) et J. BANKOWSKI.

(Avec la planche XI.)

Lorsque les méthodes d'imprégnation à l'argent, celle de Volpino et celle préconisée par l'un de nous, montrèrent que la mise en évidence du tréponème dans les lésions syphilitiques était d'une réalisation facile, on eut tout naturellement l'idée d'appliquer ces méthodes aux cerveaux des paralytiques généraux, dans le but d'y découvrir l'agent pathogène de la syphilis. Nous avons entrepris nous-mêmes, à cette époque, des recherches dans cette voie, et nous avons examiné une dizaine de pièces provenant du service du D^r Marie, à l'asile de Villejuif. Les résultats furent totalement négatifs. D'ailleurs, dès l'examen de nos premières préparations, nous nous rendîmes compte des difficultés du problème. En effet, sur ces préparations, les fibrilles nerveuses, admirablement imprégnées, formaient dans la substance corticale un feutrage si dense, que la découverte du tréponème apparaissait comme impossible sur de telles préparations. Découragés trop vite, nous abandonnâmes la question. Des découvertes ultérieures montraient cependant que ces constatations négatives devaient être attribuées à l'imperfection des méthodes et que la présence du spirochète dans le cerveau des paralytiques généraux était presque certaine : nous faisons allusion aux résultats positifs fournis par le liquide céphalo-rachidien des paralytiques, examiné d'après la méthode de Wassermann, et à la transmission d'un syphilome primaire au singe, par inoculation de substance corticale [cerveau de P.-G., Landsteiner et Poetzel (1)]. Il fallait donc rechercher avec assiduité le spirochète dans le cerveau des paralytiques, en essayant d'adapter la méthode primitive à ce genre d'investigation.

(1) LANDSTEINER et POETZEL, *Centralbl. für Bakteriolog., Referate*, 1908, t. XLI, p. 791.

Or, en février 1913, Noguchi (1), en collaboration avec Moore (2), comblait cette lacune et découvrait le tréponème là où nos propres efforts, comme, d'ailleurs, ceux de nombreux autres auteurs, étaient restés infructueux. En se servant de la méthode de Levaditi, le savant japonais réussit à déceler l'agent pathogène de la vérole dans douze cerveaux de paralytiques, âgés de trente-trois à soixante ans. Il s'agissait de cas typiques de paralysie générale, chez lesquels la maladie avait évolué de cinq à trente mois. Les parasites, d'aspect typique, étaient localisés dans la substance corticale, tout près de la surface cérébrale, et répandus d'une manière diffuse en pleine substance grise. Ils n'offraient aucun rapport avec les vaisseaux lésés et étaient absents dans les méninges infiltrées. Ce qui est frappant, c'est que Noguchi et Moore n'ont découvert le *Treponema pallidum* que chez un certain nombre des sujets examinés par eux, le pourcentage des résultats positifs ne dépassant pas le chiffre de 17 p. 100 (12 cas positifs sur 70). Dans un autre travail, plus récent, Noguchi (3) revient sur la question et publie une statistique comportant un nombre plus considérable de cas. Mais, cette fois-ci également, la présence du tréponème dans le cerveau des paralytiques est loin d'être constante; quarante-huit cerveaux seulement, parmi les deux cents pièces examinées, ont montré des spirochètes, ce qui fournit un pourcentage de 25 p. 100. A cette occasion, Noguchi donne les détails de sa technique et paraît attribuer le succès de ses investigations aux modifications qu'il a fait subir à la méthode de Levaditi. Ces modifications consistent à ajouter de la pyridine, de l'alcool et de l'acétone au bain fixateur formolé, et à laver plus longtemps (deux heures) après le traitement par l'argent. Il a donc recours à la pyridine, employée par Levaditi et Manouélian (4) dans leur procédé rapide d'imprégnation argentique.

La découverte de Noguchi a été confirmée par Marinesco et Minea (5). Dans une note présentée à l'Académie de médecine,

(1) NOGUCHI et MOORE, *The Journ. of experim. med.*, 1^{er} février 1913; *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, n° 7, 1913.

(2) MOORE, *Journ. of nervous and mental diseases*, 1913, t. XL, p. 172.

(3) NOGUCHI, *Munch. med. Woch.*, 14 avril 1913.

(4) LEVADITI et MANOUELIAN, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1906, t. LX, p. 134.

(5) MARINESCO et MINEA, *Bull. de l'Acad. de médecine*, n° 12, 1^{er} avril 1913.

ces auteurs publient un cas typique de paralysie générale, avec présence du tréponème pâle dans le cerveau. Cette fois-ci aussi il a fallu examiner 26 cas pour enregistrer cette unique constatation positive. Marinesco et Minea insistent sur la topographie des spirochètes dans le cerveau, topographie qui correspond à celle décrite auparavant par Noguchi, et relatant, en outre, un cas de méningite syphilitique de l'adulte, avec présence du tréponème dans les méninges.

Sitôt après la publication des premiers travaux de Noguchi et Moore, nous avons entrepris l'étude de cette question; grâce au riche matériel de l'asile de Villejuif, nous avons confirmé la découverte de ces savants et nous avons recueilli un certain nombre de faits nouveaux, qui ont été relatés dans deux notes présentées à la Société de Biologie (1). Dans le présent mémoire, nous donnons les détails de nos investigations et les conclusions qui s'en dégagent, au sujet de l'étiologie et de la pathogénie de la paralysie générale.

I

Au début de nos recherches, nous avons suivi la voie indiquée par Noguchi et Moore, à savoir l'étude des coupes imprégnées à l'argent. Nous nous sommes servis de l'ancienne méthode de Levaditi, sans y apporter des modifications appréciables, sauf, dans certains cas, un séjour plus prolongé des pièces dans l'alcool à 90 degrés (deux à trois jours), après la fixation au formol à 10 p. 100. Nous avons examiné, en tout, 32 cas de paralysie générale typique, dont les pièces avaient été, pour la plupart, conservées depuis longtemps dans du formol. Quelques cerveaux provenaient cependant de nécropsies plus récentes, faites depuis le début de nos recherches. De ces 32 cas, 3 seulement ont donné des résultats positifs, ce qui fournit un pourcentage d'environ 10 p. 100. Voici les observations abrégées des trois sujets dont le cerveau contenait des tréponèmes :

OBS. I. — Is..., âgé de quarante-deux ans, charcutier, entre à l'asile de Villejuif le 4 septembre 1903. Il a été hospitalisé pour la première fois le 27 août 1903, avec le certificat suivant du Dr Rueff : « Affaiblissement des facultés

(1) MARIE, LEVADITI et BANKOWSKI, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, n° 44, p. 794, 1913, et n° 17, p. 1009, 1913.

intellectuelles, actes et propos incohérents, lacunes de la moralité, crises d'excitation, alcoolisme; depuis trois mois il perdait la mémoire ». A Sainte-Anne, le Dr Dagonnet constate : paralysie générale probable, affaiblissement des facultés, alcoolisme. A Villejuif, le Dr Marie note de l'euphorie, des idées de richesse et porte le diagnostic de paralysie générale, avec alcoolisme avoué. Antécédents héréditaires nuls, *nie la syphilis*; femme normale; ni enfants, ni fausses couches. En juin 1903, le malade se calme; paralysie générale progressive, affaiblissement mental, embarras de la parole, signe d'A-R. Dans la suite, les mouvements sont mieux coordonnés, le calme devient durable. Il bénéficie de quelques heures de sortie d'essai. En juin 1904, quelques piqûres mercurielles; la ponction lombaire montre de la lymphocytose. Ictus huit jours avant l'envoi au dépôt. Le malade est réclamé par sa famille et sort fin août 1904. Cinq mois après, rechute. Wassermann positif dans le sang et le liquide céphalo-rachidien. En résumé, *paralysie générale à longue évolution*, avec fausses rémissions séparant des stades de plus en plus démentiels, cachexie finale et décès en avril 1910.

Méningo-encéphalite diffuse au point de vue macro et microscopique. Lacunes de dégénérescence au niveau des zones frontales gauches.

Constatactions histologiques. — L'imprégnation des fibrilles nerveuses est pour ainsi dire nulle. La coupe est uniformément jaune et les tissus paraissent macérés. Les tréponèmes, en assez grand nombre, sont disposés d'une façon diffuse dans la substance grise des circonvolutions, tout près de l'écorce. Certains d'entre eux sont en relation avec les parois vasculaires. Leurs ondulations sont régulières, serrées, leurs extrémités minces et incurvées. Quelques parasites paraissent dégénérés.

Obs. II. — *Boe...*, trente-huit ans, chaudronnier, entre à l'asile de Villejuif le 4 janvier 1912, par transfert de Charenton, où il était entré le 2 novembre précédent, à la suite d'un ictus congestif qui marquait le début de la maladie, et où le Dr Roger-Mignot constate : paralysie générale avec idées de grandeur et de persécution, troubles paréto-ataxiques. A l'asile Sainte-Anne, le Dr Juquelier fait le même diagnostic et remarque des troubles oculo-pupillaires manifestes, avec embarras de parole. A l'entrée à l'asile de Villejuif, on constate les mêmes signes. Le malade est affaibli et sa paralysie évolue rapidement vers la cachexie. Le 24 janvier 1913, une série d'ictus congestifs, avec turbulence intercalaire. Mort le 12 février 1913 au matin.

Nécropsie : lésions macroscopiques de la méningo-encéphalite diffuse.

Constatactions histologiques. — L'imprégnation des fibrilles est plus intense que dans le cerveau précédent. Les tréponèmes, tout aussi caractéristiques, sont de beaucoup plus rares.

Obs. III. — *Crois...*, trente-sept ans, livreur. Le 6 mars 1912, le Dr de Clérambault fait le diagnostic de *paralysie générale*. Torpeur psychique, indifférence, pupilles inertes et inégales (mydriase gauche maxima), réflexes plantaires nuls, achilléens faibles, légers tremblements des doigts et de la langue, alopécie médiane. Le malade a fait des commandes répétées dans le même

magasin ; prévenu d'escroquerie, expertise concluant à un non-lieu. Entre à Villejuif le 9 mars 1912, où le Dr Marie confirme le diagnostic de paralysie générale. Décès le 3 mai 1913, *en ictus*.

Constatations histologiques (1). — Les méninges sont fortement infiltrées par des éléments mononucléaires, lesquels sont disposés surtout autour des vaisseaux de la pie-mère ; la paroi de ces vaisseaux est nettement épaissie. Ces lésions se retrouvent également dans l'écorce cérébrale ; ici, les canaux vasculaires d'un certain calibre sont entourés de manchons formés par plusieurs rangées de leucocytes mononucléaires. Ces traînées de leucocytes à un seul noyau sont parsemées de grains de pigment jaune brun. Le nombre des spirochètes est considérable. Les parasites sont répandus d'une manière très inégale ; par endroits, ils forment de véritables foyers, alors que d'autres zones de la corticalité, très voisines des premières, en sont totalement dépourvues. Leur aspect est à ce point caractéristique qu'on peut les distinguer facilement des fibrilles nerveuses ; celles-ci ont les ondulations larges et irrégulières, sont plus épaisses et se colorent en brun, cependant que les tréponèmes sont d'un noir intense. Par endroits, les parasites sont en relation intime avec les parois vasculaires (Voy. fig. 1 et 2 de la planche XI). En général, ils forment une couche homogène, située tout près de la surface du cerveau ; on n'en décèle pas dans la substance blanche. Enfin, certains spirochètes, surtout ceux qui sont au voisinage des cellules nerveuses, sont entortillés sur eux-mêmes et forment des boucles, absolument identiques à celles que nous avons constatées antérieurement dans les lésions syphilitiques proprement dites, et que Hoffmann (2) a vues sur les préparations de cerveaux de paralytique que lui avait envoyées Noguchi (Voy. fig. 1, e, planche XI).

En résumé, la méthode à l'argent, même non modifiée, permet de déceler le tréponème dans le cerveau des paralytiques généraux. Les résultats positifs sont cependant loin d'être constants. Ainsi que l'ont vu Noguchi et Moore d'une part, Marinesco et Minea d'autre part, il faut examiner un grand

(1) Les coupes intéressent les régions qui, à l'examen ultra-microscopique, se sont montrées riches en tréponèmes (Voir plus loin).

(2) HOFFMANN, *Deutsche med. Woch.*, 1913, n° 11.

nombre de cerveaux si l'on veut enregistrer quelques constatations positives. La meilleure statistique publiée jusqu'à ce jour est celle de Noguchi; aussi l'auteur a-t-il dû pratiquer l'examen de 200 cas, pour l'obtenir.

Comment expliquer cette présence inconstante du tréponème dans le cerveau des paralytiques généraux, révélée par l'examen des coupes imprégnées à l'argent? Deux hypothèses peuvent être formulées à ce sujet. On peut admettre, en premier lieu, que l'étiologie de la maladie n'est pas unique et que les cas à spirochètes sont les seuls à reconnaître, comme agent étiologique, le tréponème, les cas négatifs appartenant à des types de paralysie générale de provenance non-syphilitique. En second lieu, on peut expliquer cette inconstance des résultats positifs en faisant intervenir les imperfections de la méthode. Plusieurs considérations nous ont fait admettre cette seconde façon de voir et soutenir, dès le début de nos investigations (1), que l'agent étiologique de la syphilis doit exister dans le cerveau des paralytiques beaucoup plus fréquemment que ne le révèle le procédé de l'imprégnation à l'argent. La nature le plus souvent spécifique de la paralysie générale, établie cliniquement par les anciens auteurs, en particulier par Fournier, ne ressort-elle pas de la grande fréquence des réactions positives, lorsqu'on examine, d'après le procédé de Wassermann, le sérum et le liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux? D'un autre côté, il suffit de jeter un coup d'œil sur les préparations de cerveau de paralytiques *bien imprégnées à l'argent*, pour se rendre compte des difficultés qui surgissent lorsqu'on est à la recherche du tréponème caché dans l'épais feutrage de fibrilles nerveuses. D'ailleurs, l'examen de nos propres préparations et des coupes qu'ont bien voulu nous envoyer Noguchi et Marinesco, montre bien que les tréponèmes ne sont visibles que lorsque l'imprégnation des fibrilles, pour des raisons que nous ignorons encore (2), est défectueuse (coupes presque uniformément

(1) Cf. notre première note à la Société de Biologie (*loc. cit.*).

(2) Nous avons pensé que la macération du cerveau (conservation pendant un temps variable à la température du laboratoire) diminuerait l'affinité des fibrilles nerveuses pour l'argent sans toucher à celle des spirochètes. Il n'en est rien, d'après nos expériences.

jaunes, à fibrilles brunâtres). Enfin, nous nous sommes convaincus maintes fois que, même lorsque le spirochète est visible dans le cerveau, par les méthodes dont nous parlerons plus loin, le procédé des coupes peut donner des résultats absolument négatifs (Cf. également Noguchi).

Les rapports entre l'inconstance de constatations positives et les imperfections de la technique employée nous sont donc apparus, dès le début, comme un fait absolument certain. Aussi avons-nous cherché d'autres moyens d'investigation, plus fidèles et plus rapides.

II

Nos nouvelles constatations montrent qu'à la condition de se servir d'une technique appropriée et d'examiner systématiquement chaque circonvolution cérébrale, on réussit à découvrir le tréponème dans la grande majorité, sinon dans tous les cas de paralysie générale.

Méthode. — Les recherches doivent porter sur des cerveaux frais, la nécropsie ayant été pratiquée le plus tôt possible (1). On examine chaque circonvolution cérébrale, en commençant par les zones postérieures des frontales. Après dissection de la pie-mère, on découpe avec des petits ciseaux courbes un petit fragment (2 à 3 millimètres) d'écorce cérébrale et on le dissocie dans deux à trois gouttes d'eau salée, sur une lame. L'émulsion sert à faire une préparation pour l'ultra (2) et des frottis, en ayant soin de la diluer préalablement. Les frottis sont colorés : 1° à l'encre de Chine; 2° par la méthode de Fontana; 3° par le procédé de Loeffler.

1° *Encre de Chine* (procédé de Burri). — On mélange une goutte de l'émulsion de cerveau à une goutte d'encre de Chine, on étale en couche mince et on dessèche (Voy. fig. 5, planche XI.)

2° *Méthode de Fontana-Tribondeau* (3). — a) Une goutte de l'émulsion cérébrale est étalée sur lame. On fixe pendant une minute en versant sur la lame quelques gouttes de la solution suivante :

Acide acétique.	1 cent. cube.
Formol (40 0/0).	2 cent. cubes.
Eau distillée.	100 cent. cubes.

(1) Nous avons cependant décelé de très nombreux tréponèmes chez un paralytique dont la nécropsie a été pratiquée quarante-huit heures après la mort.

(2) Noguchi a vu le premier des spirochètes à l'ultra-microscope, dans un cas de paralysie générale.

(3) FONTANA, *Pathologica*, 1913, t. V, n° 109; TRIBONDEAU, *Bull. de la Soc. française de dermatologie*, 7 novembre 1912.

b) On lave à l'eau courante.

c) On mordance à chaud (dégagement de vapeurs) pendant 30 secondes (sur lame) avec la solution suivante :

<i>Acide phénique liquéfié</i>	1 cent. cube.
<i>Tanin</i>	5 grammes.
<i>Eau distillée</i>	100 cent. cubes.

d) On lave à l'eau courante.

e) On imprègne à l'argent, à chaud (dégagement de vapeurs) pendant 30 secondes, avec la solution suivante :

<i>Nitrate d'argent</i>	0 gr. 25.
<i>Eau distillée</i>	100 cent. cubes.
<i>Ammoniaque liquide</i> : autant de gouttes qu'il en faut pour redissoudre le précipité qui se forme après les premières gouttes d'ammoniaque.	

f) On lave à l'eau courante et on dessèche.

Les spirochètes se colorent en brun noir sur fond jaune. Il est facile de les différencier des fibrilles nerveuses, lesquelles sont colorées en jaune clair et ont des ondulations larges et irrégulières (Voy. fig. 3 de la planche XI.)

3^e *Procédé de Læffler*. — Comme pour la coloration des cils; avoir soin de diluer suffisamment l'émulsion cérébrale avec de l'eau distillée. Les spirochètes se colorent en rouge foncé (Voy. fig. 4 de la planche XI).

Nous avons examiné, par les procédés sus-indiqués, les cas suivants :

Obs. I. — *Bourg...*, quarante-neuf ans; syphilis datant de 1900. Entre à l'asile de Villejuif le 21 mars 1913. Embarras de parole, tremblements musculaires, signes d'A.-R., anesthésie bucco-linguale, en un mot symptômes typiques de paralysie générale. Wassermann *positif* avec le sérum. Affirme avoir été traité par le 606 il y a trois mois. Syphilis conjugale. Décès le 16 avril 1913. Nécropsie faite très rapidement après la mort. Lésions caractéristiques.

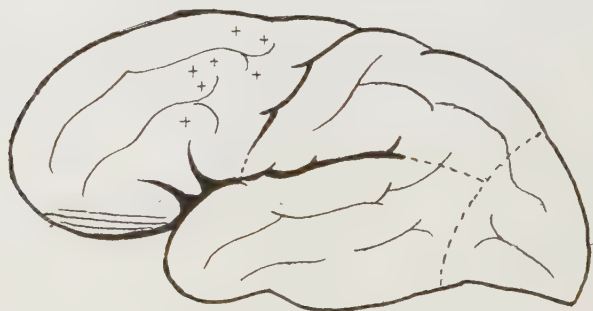


FIG. 4. — *Bourg...*, H. G.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* = pas de spirochètes;
b) *Méthodes rapides* = H. G. : spirochètes assez nombreux vers

la partie postérieure de la I^e, II^e et III^e frontale et au milieu de la frontale ascendante (Voir fig. 1).

OBS. II. — Scho..., trente-sept ans, employé. Le 1^{er} novembre 1912, le Dr Guillain constate des troubles cérébraux caractérisés par de la confusion mentale avec amnésie et actes à caractères démentiels, nécessitant le transfert dans un asile spécial. A Sainte-Anne, le Dr Briand fait le diagnostic de paralysie générale avec apathie, hésitation de la parole, inégalité pupillaire. Entre à Villejuif le 5 novembre 1912, et, le 6, le Dr Marie note : *paralysie générale avancée* (démence et faiblesse générale, confusion amnésique). *Nie la syphilis.* Décès en ictus le 30 avril 1913 (*ictus depuis la veille*).

Lésions caractéristiques.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* = pas de spirochètes;

b) *Méthodes rapides* : H.D. = pas de spirochètes; H.G. = rares parasites dans les circonvolutions occipitales (Voy. fig. 2).

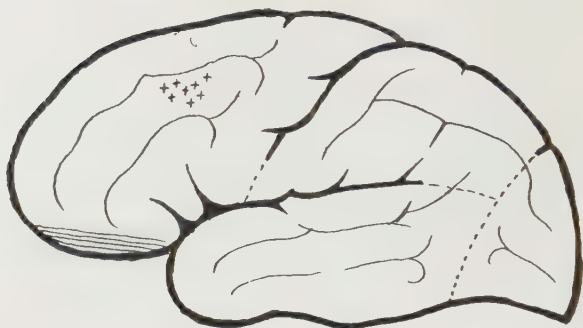


FIG. 2. — Scho..., H. G.

OBS. III. — Cette observation a été résumée page 580.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* = nombreux spirochètes (Voir fig. 1 et 2 de la planche XI);

b) *Méthodes rapides* : H.G. = Très nombreux tréponèmes vers la partie postérieure de la seconde frontale; H.D = très nombreux spirochètes à la partie postérieure de la seconde frontale, non rares vers la partie postérieure de la I^e et III^e frontale, dans la frontale ascendante, la pariétale ascendante et la fosse sylvienne. Pas de parasites au niveau de deux plaques de sclérose situées au niveau de la I^e pariétale et dans la région occipitale (Voy. fig. 3 et 4 : e, plaque sclérosée).

FIG. 3. — *Crois...*, H. G.FIG. 4. — *Crois...*, H. D.

OBS. IV. — *Bour...*, quarante-neuf ans, typographe. Le Dr Legras constate le 7 novembre 1912 : alcoolisme chronique, affaiblissement intellectuel, dépression, désorientation, propos désordonnés, hallucinations, gâtisme, contraction pupillaire, tremblement des doigts. Condamné à trois mois de prison pour vol. Le 23 novembre 1912, le Dr Briand fait le diagnostic de paralysie générale avec aphasie passagère consécutive à un ictus récent; hésitation de la parole, saturnisme. Entre à Villejuif le 22 février 1913, où le Dr Marie diagnostique la paralysie générale avancée. *Nie la syphilis*. Décès le 6 mai 1913, *en ictus*.

Examen histologique du cerveau. — Autour des vaisseaux de la substance grise, accumulation de cellules mononucléaires en assez grand nombre.

Ces lésions vasculaires ne sont pas très intenses.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* = pas de spirochètes;

b) *Méthodes rapides* = H.G. : spirochètes rares au niveau de

la circonvolution de Broca, très rares vers le milieu de la frontale ascendante; H.D. = très rares parasites vers la partie postérieure de la 1^{re} frontale (Voir fig. 5 et 6).

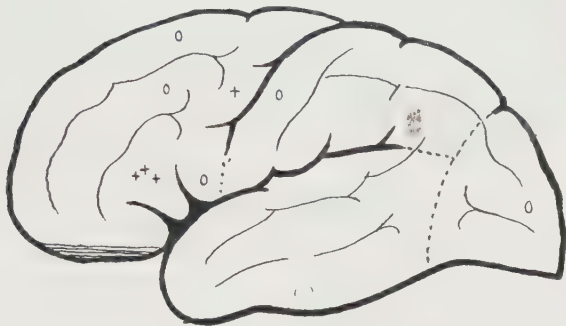


FIG. 5. — Bour..., H. G.

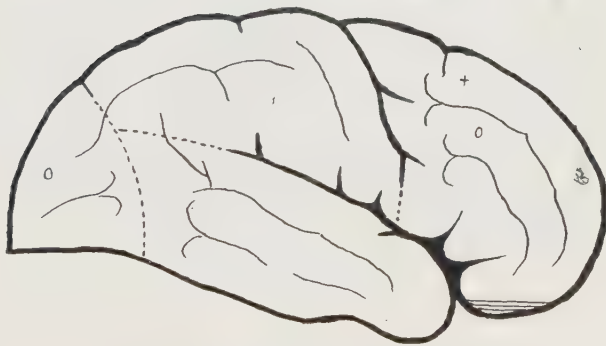


FIG. 6. — Bour..., H. D.

OBS. V. — Bois..., quarante-six ans, forgeron. Le 23 octobre 1912, le Dr Dupré constate : paralysie générale progressive, démence, inconscience, propos incohérents, euphorie, embarras considérable de la parole, tremblements des lèvres et de la langue, pupilles inégales. Condamné à trois mois de prison, le 5 septembre 1912, pour vol et complicité. A Sainte-Anne, le Dr Briand confirme le diagnostic de paralysie générale. Entre à Villejuif le 1^{er} mars 1913, où le Dr Marie constate, en plus, des troubles oculo-pupillaires et de la mégalomanie. *Nie la syphilis*. Décès le 6 mai 1913, *en ictus*.

Examen histologique du cerveau : Méninges épaissies, avec forte infiltration par des cellules mononucléaires. Les fibrilles nerveuses sont fortement imprégnées. Dans la substance corticale, les vaisseaux d'un certain calibre sont entourés par des manchons de mononucléaires.

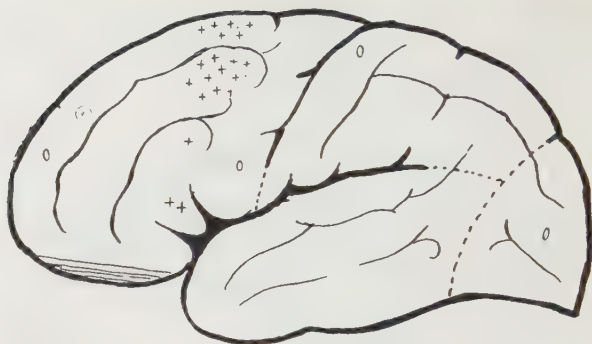


FIG. 7. — Bois..., H. G.

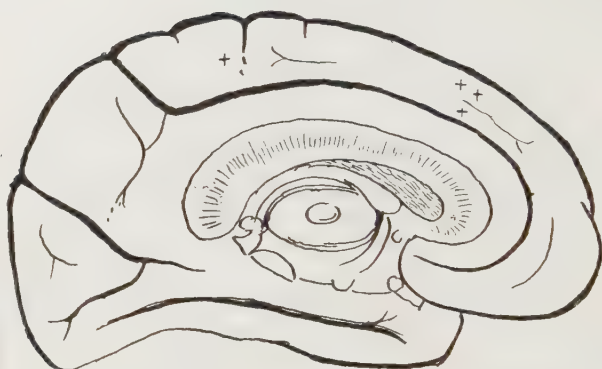


FIG. 8. — Bois ..., H. G.



FIG. 9. — Bois..., H. D.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* = pas de spirochètes;

b) *Méthodes rapides* = *H.G.* : Très nombreux spirochètes (mobiles à l'ultra-microscope) au niveau de la partie postérieure de la II^e frontale, assez nombreux vers la partie postérieure de la I^{re} frontale et de la frontale interne, rares dans la III^e frontale et la circonvolution de Broca. *Le liquide ventriculaire* (ventricule latéral gauche), centrifugé, montre de rares tréponèmes dans le culot de centrifugation ; *H.D.* : pas de parasites (Voy. fig. 7, 8 et 9).

OBS. VI. — *Can...*, cinquante ans. Le 28 avril 1913, le Dr Bruck constate du délire et demande l'internement; le 29, le Dr Briand fait le diagnostic de paralysie générale avec idées incohérentes de satisfaction, agitation par intervalles, hésitation de la parole, inégalité pupillaire. Malade depuis janvier 1912, est interné à Villejuif le 28 avril 1913. Décès le 9 mai 1913, *en ictus*.

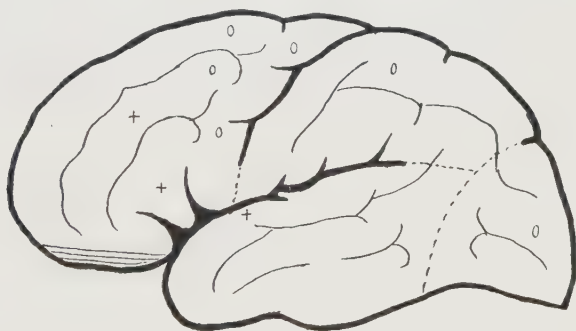


FIG. 10. — *Can...*, H. G.

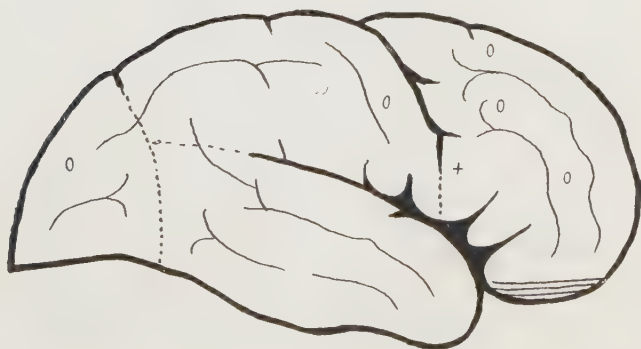


FIG. 11. — *Can...*, H. D.

Examen histologique du cerveau. — Lésions méningées très intenses, infiltration lymphocytaire autour des vaisseaux de la substance grise de l'écorce.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* : pas de tréponèmes.

b) *Méthodes rapides* : *H.G.* = très rares parasites vers le milieu de la II^e frontale, au niveau de la circonvolution de Broca et dans la fosse sylvienne; *H.D.* : très rares spirochètes vers la partie inférieure de la frontale ascendante (Voir fig. 10 et 11).

Obs. VII. — *Dum...*, trente-sept ans. Le 16 février 1913, le Dr de Clérambault diagnostique la paralysie générale, avec mégalomanie, idées de richesse et de bonheur universel. Inégalité pupillaire, réflexes rotuliens très exagérés. Le Dr Briand, à Sainte-Anne, note des idées ambitieuses incohérentes, hésitation de la parole et de l'inégalité pupillaire. Entre à Villejuif le 17 février 1913. Le Dr Marie confirme le diagnostic de paralysie générale, avec embarras de la parole, inégalité pupillaire et A. R. *Syphilis à quatorze ans* (le testicule gauche est volumineux). Le malade dit avoir eu des coliques de plomb. Décédé le 16 mars 1913 à la suite d'un ictus apoplectiforme.

Examen histologique. — Lésions méningées assez intenses; dans la substance grise du cortex, altérations péri-vasculaires typiques. Imprégnation intense des fibrilles.

Tréponèmes : a) *Coupes à l'argent* = pas de spirochètes.

b) *Méthodes rapides* : *H.G.* : assez nombreux parasites vers le milieu de la frontale ascendante, rares à la partie postérieure de la I^{re} frontale, et en avant et en arrière de la II^e frontale; très rares au milieu de la pariétale ascendante; *H.D.* : très rares parasites vers la partie postérieure de la I^{re} frontale; pas de tréponèmes dans les noyaux gris du bulbe (Voir fig. 12 et 13).

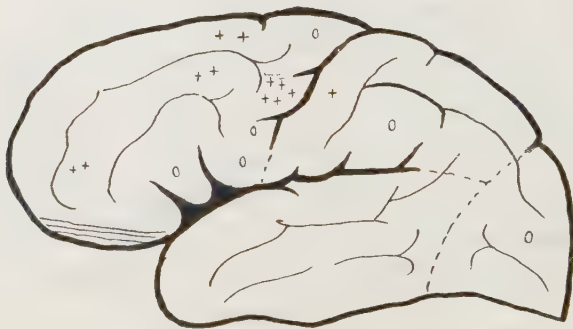


FIG. 12. — *Dum...*, H. G.

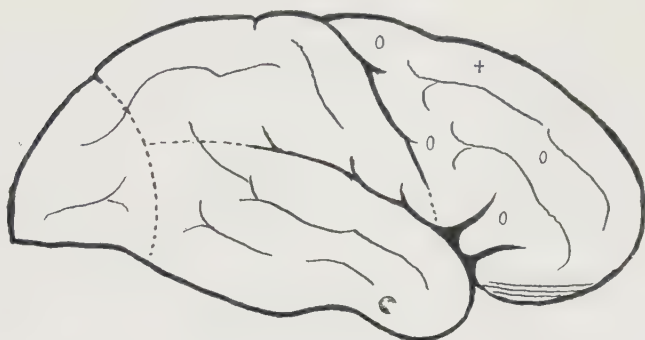


FIG. 13. — Dum..., H. D.

OBS. VIII. — Douc..., trente ans. Le 27 mars 1913, le Dr Roger-Mignot diagnostique la paralysie générale avec affaiblissement des facultés intellectuelles, euphorie, troubles paréto-ataxiques. Le 1^{er} avril, à Sainte-Anne, le Dr Dupré confirme le diagnostic de paralysie générale et constate des idées incohérentes de satisfaction, une hésitation de la parole, de l'inégalité pupillaire. Entre à Villejuif le 1^{er} avril 1913, où le Dr Marie diagnostique, à son tour, la paralysie générale. Le 4 mai, on note un ictus récent et de l'affaiblissement graduel. Décédé le 16 mai.

Examen histologique. — Lésions typiques.

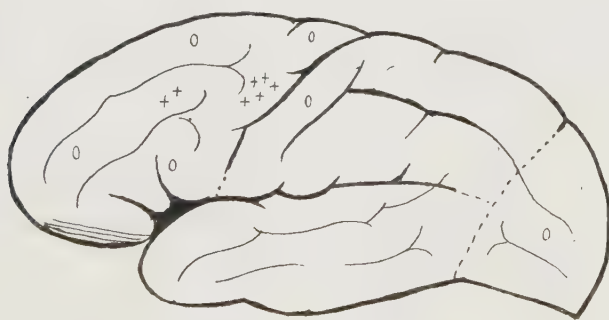


FIG. 14. — Douc..., H. G.

Tréponèmes : Méthodes rapides = H. G. : assez nombreux parasites vers le milieu de la frontale ascendante, rares vers la partie postérieure de la II^e frontale; H. D. : très rares spirochètes vers la partie postérieure de la seconde frontale (Voir fig. 14 et 15).

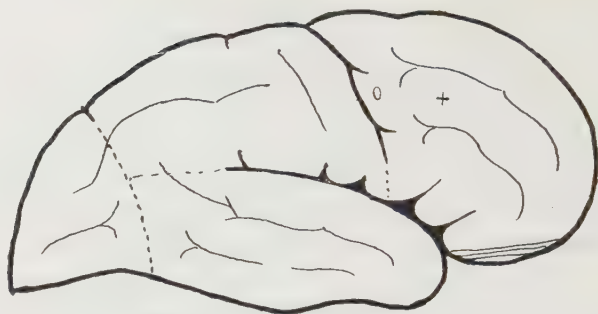


FIG. 15. — Douc..., H. D.

Obs. IX. — Ger..., trente-huit ans. Le 12 avril 1913, le Dr Camus fait le diagnostic de paralysie générale, avec léger affaiblissement des facultés, vagues idées de persécution, hallucinations olfactives et auditives. Troubles dysarthriques très accusés, myosis et rigidité des pupilles. A Sainte-Anne, le Dr Briand note : dégénérescence mentale avec paralysie générale, hésitation de la parole, pupilles resserrées et inégales. Entre à Villejuif le 12 avril 1913, où le Dr Marie confirme le diagnostic de paralysie générale. *Syphilis à l'âge de dix-huit ans*, saturnisme. Décédé le 21 mars 1913, *sans ictus*. Le cerveau est macroscopiquement très lésé. *Les méninges sont blanches, épaisses, très adhérentes.*

Tréponèmes : Absence de spirochètes, par toutes les méthodes employées. Histologiquement, on constate des lésions périvasculaires très intenses dans la substance grise du cerveau, et un épaississement très accusé de méninges cérébrales.

En résumé, nous avons examiné *neuf cerveaux frais* (1), provenant de paralytiques généraux, chez lesquels la maladie a évolué d'une façon typique ; huit de nos malades sont morts à la suite d'ictus apoplectiformes. La date exacte du début de la paralysie générale, chez nos sujets, est difficile à préciser, comme toujours en pareil cas ; *il s'agit surtout de paralytiques chez lesquels les troubles morbides ont évolué rapidement, puisque la maladie a été diagnostiquée de un à quatorze mois avant le décès. Nous n'avons enregistré des antécédents syphilitiques*

(1) Depuis la rédaction de ce mémoire, nous avons enregistré plusieurs autres résultats positifs. Un de ces nouveaux cas (le malade Coll...) est intéressant par la *longue durée de la paralysie générale* (début en janvier 1912) et par la *présence de nombreux tréponèmes dans les tubercules quadrijumeaux et les bulbes olfactifs*.

que chez trois de nos malades (Obs. I, VII et IX); le Wassermann a été positif dans la majorité des cas.

Examinés par les méthodes rapides (ultramicroscope, procédé de Fontana, etc.), ces neuf cerveaux ont fourni huit résultats positifs, soit un pourcentage de 88,8 p. 100. Par contre, le procédé des coupes imprégnées à l'argent nous a permis d'enregistrer une seule fois la présence du tréponème dans la corticalité cérébrale, soit un pourcentage de 11,1 p. 100. Le contraste entre ces deux moyens d'investigation est donc des plus frappants, les méthodes basées sur l'examen direct du cerveau frais étant de beaucoup supérieures au procédé des coupes; cette dernière technique peut, en effet, fournir des résultats absolument négatifs, alors même que la corticalité cérébrale, examinée à l'ultra, ou sur les frottis, montre des quantités énormes de tréponèmes (Observation V, par exemple).

Quant à la valeur des divers procédés rapides dont nous nous sommes servis dans nos investigations, il nous a semblé que celui de l'examen ultra-microscopique est préférable entre tous. Lorsque cet examen montre dans les circonvolutions des tréponèmes nombreux, assez nombreux, ou même non rares, les frottis, colorés à l'encre de Chine ou d'après la technique de Fontana, donnent également des résultats positifs; mais quand, à l'ultramicroscope, on ne décèle que des parasites rares ou très rares, il devient plus difficile de les découvrir sur les frottis. Nous recommandons donc de commencer toujours par pratiquer l'examen des circonvolutions des régions antérieures du cerveau par le procédé de l'ultra, quitte à le contrôler ensuite par les autres méthodes.

Tous les huit sujets dont le cerveau, examiné à l'état frais, a montré des tréponèmes typiques, sont morts à la suite d'ictus apoplectiformes. Il y a donc lieu de conclure que *les tréponèmes existent d'une façon constante dans l'écorce cérébrale des paralytiques généraux qui succombent en ictus*. Leur quantité varie sensiblement d'un cas à l'autre, ainsi que leur topographie. Trois fois sur huit, les parasites étaient aussi abondants que dans certains frottis de chancre syphilitique; chez trois autres malades, au contraire, ils étaient si rares qu'il a fallu les chercher pendant longtemps. Ce qui est frappant, c'est *la disposition des tréponèmes par foyers plus ou*

moins circonscrits. Ainsi, chez notre second malade (*Scho...*), les parasites n'existaient que dans la région occipitale gauche, tandis que, chez le cinquième sujet (*Bois...*), l'îlot spirochétien occupait une zone correspondant à la partie postérieure des circonvolutions frontales gauches et à la première frontale interne, avec un maximum dans la deuxième frontale. Comme l'a déjà remarqué Noguchi, les tréponèmes se trouvent dans le cortex proprement dit; l'examen de la substance blanche immédiatement sous-jacente à un foyer riche en parasite nous a fourni, en effet, des résultats négatifs.

Ajoutons que, par nos procédés, nous avons réussi à déceler les spirochètes dans le *liquide ventriculaire* (ventricule latéral gauche); il s'agit d'un cerveau (Obs. V) dont les circonvolutions frontales correspondantes étaient riches en parasites. Enfin, dans plusieurs cas, l'examen du bulbe, de la moelle et de quelques ganglions rachidiens nous a fourni des résultats négatifs.

Etant donnée cette présence presque constante du tréponème dans le cerveau des paralytiques généraux typiques, il nous paraît intéressant de citer une observation concernant *un cas de pseudo-paralysie* générale, due très probablement à l'*absinthisme*, associé à l'intoxication mercurielle, avec absence de parasites dans la corticalité cérébrale; la voici :

OBS. X. — *Thim...*, cinquante-cinq ans. Le 14 septembre 1909, on note de la démence et, vers la même époque, le Dr Barbé fait le diagnostic de paralysie générale progressive. En octobre 1909, le Dr Marie constate un affaiblissement des facultés intellectuelles et de la mémoire, avec euphorie, embarras de la parole. Absinthisme avoué. Tremblement mercuriel (a été doreur au mercure). Le 30 octobre 1909, on constate de l'affaiblissement intellectuel et, en février 1910, de l'embarras de la parole et du myosis. Enfin, en septembre 1911, le Dr Marie fait le diagnostic de *pseudo-paralysie générale absinthique*. Décédé le 28 mai 1913. La maladie a duré de septembre 1909 à mai 1913, soit quatre ans.

Absence de tréponème dans le cerveau, qui, macroscopiquement, se montre très lésé.

*
* *

Les faits que nous venons d'exposer confirment donc la découverte de Noguchi, et permettent de formuler ainsi l'*étiologie et la pathogénie de la paralysie générale* :

La paralysie générale est une maladie due à la pullulation du tréponème dans l'écorce cérébrale et aux lésions que cette pullulation engendre. La prolifération des parasites paraît procéder par poussées successives; ses localisations varient d'un cas à l'autre, tout en étant plus fréquentes au niveau des zones antérieures du cerveau. Il y a une analogie frappante entre ces poussées tréponémiques cérébrales, d'une part, et l'apparition périodique des manifestations spécifiques cutanées et muqueuses, d'autre part. On pourrait comparer ces foyers multiples et successifs à autant de syphilomes du cortex, laissant après eux une sclérose équivalente à l'induration post-chancreuse. Lorsqu'un foyer parasitaire se stérilise spontanément, après avoir engendré des lésions indélébiles, un autre se forme dans des circonvolutions encore intactes; cela explique pourquoi les zones cérébrales les plus lésées macroscopiquement ne sont pas toujours, d'après nos observations, les plus riches en parasites. Enfin, il nous paraît probable que l'*ictus apoplectiforme* des paralytiques correspond à ces poussées tréponémiques aiguës, surtout lorsque ces poussées sont localisées au niveau des zones motrices. On aura donc plus de chances de déceler le tréponème dans le cerveau des paralytiques qui succombent en ictus, que chez les malades qui meurent dans l'intervalle des poussées parasitaires aiguës, à la suite de maladies intercurrentes. Nous en avons la preuve dans notre observation n° 9. En effet, le malade est décédé non pas en ictus, mais par suite d'un affaiblissement général; aussi son cerveau, malgré les lésions anciennes intenses qu'il présentait, était dépourvu de tréponèmes. Il n'en est pas moins vrai, cependant, que les parasites peuvent persister dans la corticalité cérébrale et être décelés à la nécropsie, malgré l'évolution lente de la paralysie générale et sa durée exceptionnellement longue. Nous avons fait une telle constatation chez un de nos sujets (*Is...*, obs. I, première série), chez lequel l'affection a évolué pendant *sept ans*, avec fausses rémissions.

LÉGENDE DE LA PLANCHE XI

FIG. 1. — *Crois...* (Voy. observ., p. 580). Coupe de la II^e circonvolution frontale; (imprégnation à l'argent). Gross. : 750/1, *v*, vaisseau sanguin; *h*, hématies; *p*, corpuscules ronds pigmentés; *s*, spirochètes; *e*, tréponèmes enroulés sur eux-mêmes (formes en boucle); *f*, fibrilles nerveuses.

FIG. 2. — *Crois...* Même préparation, même grossissement; *v*, vaisseau sanguin; *h*, hématies; *s*, spirochètes dans la paroi vasculaire.

FIG. 3. — *Bois...* (Voy. obs., p. 587). Frottis de circonvolution cérébrale, coloré par la *méthode de Fontana-Tribondeau*. Gross. : 800/1.

FIG. 4. — *Crois...* (Voy. obs., p. 580). Frottis de circonvolution cérébrale, coloré par la *méthode de Læffler*. Gross. 800/1.

FIG. 5. — *Bois...* (Voy. obs., p. 587). Frottis de circonvolution cérébrale, coloré par le *procédé de Burri* (encre de Chine).

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

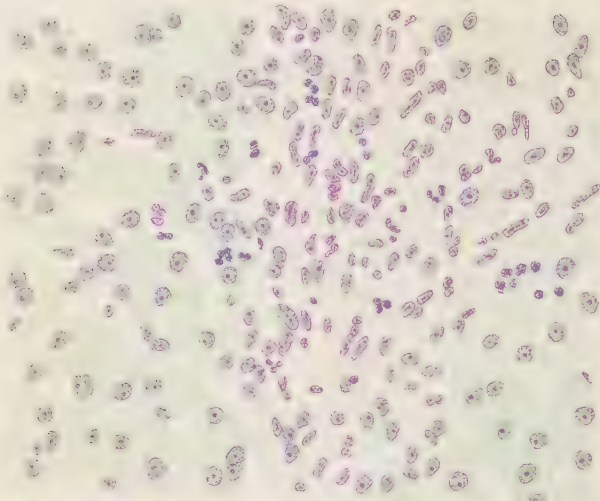


Fig. 7.

Fig. 4.

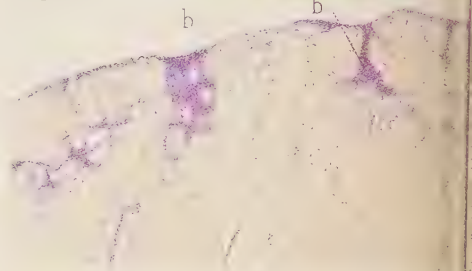
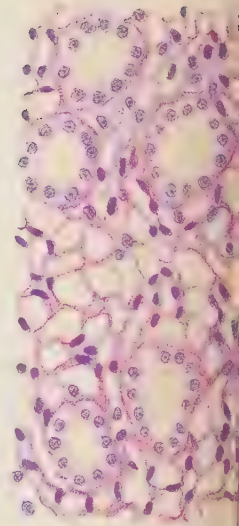
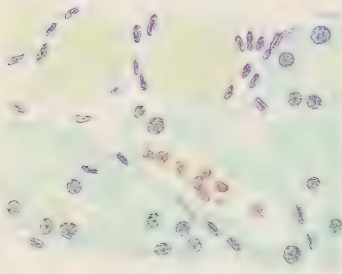


Fig. 5.



Fig. 3.

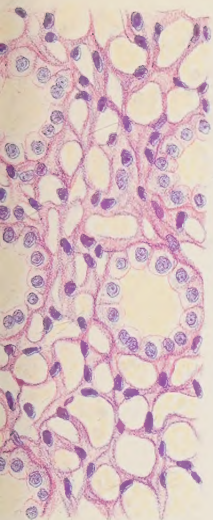


Fig. 2.

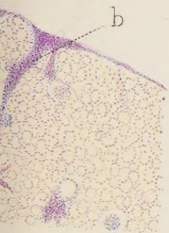


Fig. 1.



Fig. 6.



Fig. 8.

